

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Analyse transcriptionnelle du microRNA-223 chez le poulet dans le contexte du lymphome induit par le virus de la maladie de Marek

Cheritel, Halima

Award date:
2016

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Analyse transcriptionnelle du microRNA-223 chez le poulet dans le contexte du lymphome induit par le virus de la maladie de Marek

CHERITEL Halima

Résumé

Les microARNs (miRs) sont de petites séquences d'ARN d'environ 22 nucléotides impliqués dans la régulation post transcriptionnelle de l'expression des gènes. Ceux-ci jouent de nombreux rôles dans différents processus physiologiques tels que l'embryogenèse, le cycle cellulaire. Une dérégulation de leur expression est identifiée dans le développement de nombreux cancers. Le Gallid herpesvirus 2 (GaHV-2) est un *alpha*herpesvirus oncogénique hautement contagieux responsable de l'apparition des lymphomes T chez le poulet. Durant son cycle viral, ce virus dérégule l'expression de certains miRs cellulaires du poulet dont le gga-miR-223 (*gallus gallus*) qui se retrouve réprimé. Les recherches se sont orientées vers la caractérisation des processus cellulaires et viraux impliquant cette répression. Des études ont montré que hsa-miR-223 (*homo sapiens*) était exprimé dans les cellules hématopoïétiques et plus spécifiquement dans la lignée myéloïde. Aussi, la répression de son expression était responsable de plusieurs désordre inflammatoires et des cancers tels que les leucémies, ce qui suppose son rôle comme suppresseur de tumeur. Le travail de ce mémoire s'est focalisé sur l'étude du transcrit primaire du gga-miR-223 car jusqu'à présent, aucune donnée n'existe concernant l'organisation génomique du gga-miR-223. Lors de cette étude, une première analyse bio-informatique a été réalisée et différents isoformes transcriptionnelles du gga-pri-miR-223 ont été identifiées. Une cinétique de l'expression du gga-miR-223 a été réalisée par qRT-PCR pour déterminer le système biologique adéquat pour l'étude du gga-pri-miR-223. Les transcrits primaire du gga-miR-223 ont été enrichie dans l'échantillon testé en séparant la fraction nucléaire et cytoplasmique. Enfin, différents amplicons du gga-pri-miR-223 ont été obtenus par PCR nichée puis envoyées au séquençage. Les résultats ont montré qu'il existait deux isoformes transcriptionnels potentiels du gga-pri-miR-223 dans les cellules des vaisseaux sanguins embryonnaires de poulet après 78h d'incubation avec une forme épissée et non épissée respectivement. Les données constituent une base solide dans l'identification du site d'initiation de la transcription et la caractérisation du promoteur de gga-miR-223.

Mémoire de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2016

Promoteur: B. Muylkens

Remerciements

Avant tout, je tiens à remercier mon promoteur et directeur du laboratoire de l'URVI Mr. Benoit Muuylkens de m'avoir permis d'accomplir ce travail et de m'avoir attribué la faveur d'être autonome. Son soutien dans mes efforts et ses conseils ont contribué à la réalisation de ce travail.

Mes remerciements les plus sincères s'adressent à mon encadrante Mme. Isabelle Gennart Ainsi que le post doctorant Mr. Damien Coupeau qui m'ont crédité de leur confiance pour cette étude et pour leur bienveillance, la pertinence de leurs suggestions et aussi pour la somme de leurs conseils et de leurs recommandations durant toute la période de mon travail de mémoire.

Je voudrais exprimer toute ma reconnaissance aux mémorantes du laboratoire : Charlotte Thieffry, Céline et Lisa Frau, sans oublier la stagiaire Elodie Debolt qui ont permis la réalisation de ce travail dans la joie et la bonne humeur même dans les moments pénibles.

Mes profonds remerciements à toute l'équipe du laboratoire de l'URVI qui m'a encouragé dans cette voie et qui ont contribué à rendre l'atmosphère de travail plus agréable.

Je ne peux oublier de remercier ma famille et spécialement mes parents qui m'ont été d'un grand aide moral pour persévérer et traverser les moments difficiles. Un petit remerciement qui s'adresse à mon petit chat « philips » qui a passé avec moi toutes les nuits blanches.

Table des matières

Introduction	4
I. La maladie de Marek (MD)	4
1- Historique	4
2- Formes cliniques	4
3- Physiopathologie virale	5
4- Le virus de la maladie de Marek	5
II. La régulation épigénétique	9
1- Modifications post-traductionnelles des histones	9
2- Méthylation de l'ADN	10
III. Initiation de la transcription et « core » promoteur	11
IV. Le mécanisme d'épissage	12
V. Les miRs	14
1- Localisation génomique des transcrits contenant les miRs	14
2- Transcription des miRs	16
3- Processus de maturation des miRs	16
4- Interaction entre ARNm/miR	18
5- Mécanismes régulés par le miR au niveau de l'ARNm	18
6- Régulation des miRs	19
VI. Rôles du miR-223 dans l'hématopoïèse normale, infection et l'inflammation	21
VII- Herpesvirus et régulation épigénétique des gènes cellulaires	29
1- Influence du GaHV-2 sur les miRs cellulaires	30
Objectifs du travail	30
Matériel et méthodes	31
I. Culture cellulaire	31
II. Extraction de la rate d'embryons de poulets	32
III. Extraction des vaisseaux sanguins embryonnaires	32
IV. Extraction d'ADN et quantification	32
V. Séparation nucléaire et cytoplasmique	32
VI. Extraction d'ARN et quantification	33
VII. Traitement de l'ARN à la DNase I	33
VIII. La transcription inverse	33
III. La réaction PCR (polymerase chain reaction)	34

IV. qRT-PCR (PCR quantitative en temps réelle) du miR-223 du poulet	36
V. Transformation bactérienne.....	38
VI. Criblage des bactéries avec un vecteur recombinant.....	38
VII. Mini préparation de l'ADN plasmidique	38
Résultats	39
1- L'analyse bio-informatique des isoformes transcriptionnels primaires potentiels du gga-miR-223.....	39
2- Amplification du gga-pri-miR-223 par la PCR nichée	43
3- Choix d'un système biologique adapté pour l'étude du gga-pri-miR-223	46
4- Détection du gga-pri-miR-223 par PCR et qRT-PCR	48
Discussion	53
Conclusion et perspectives	58
La bibliographie	59

Introduction :

I. La maladie de Marek (MD)

1- Historique :

La maladie de Marek (MD) a été décrite pour la première fois comme une polynévrite par le vétérinaire Hongrois Josef Marek en 1907 (Marek, 1907). La MD touche principalement les poulets (*Gallus Gallus*). Cependant, d'autres espèces aviaires peuvent être infectées telles que : la caille, le faisan et la dinde (Payne, 2004).

En 1906, il a été établi que la MD est contagieuse, transmissible et causée par l'infection d'un herpesvirus nommé virus de la maladie de Marek (MDV) rebaptisé Gallid Herpes virus (GaHV-2) (Biggs, 2004). Des isolats de ce virus ont été obtenus à partir de co-cultures de cellules sanguines ou tumorales de poulet et de cellules de reins de poulets (Churchill & Biggs, 1967).

Au cours des années 1950, le développement industriel de l'élevage agricole a augmenté la sévérité de la MD et a induit l'apparition d'une forme aigue de cette dernière. Cette nouvelle forme a engendré un taux de mortalité élevé (30-60%) chez les animaux atteints par la maladie en Europe et aux Etats-Unis (Benton & Cover, 1957).

L'impact économique et épidémiologique n'a pas cessé d'augmenter jusqu'à la mise au point d'un vaccin par l'atténuation de l'isolat virulent HPRS-16 suite à des passages successifs en culture de cellules primaires de canard (Churchill *et al*, 1969). Un autre vaccin a été créé par la suite à partir d'un virus proche de GaHV-2 chez la dinde qui est Herpesvirus de Turkey (HVT) renommé plus tard *Meleagrid herpesvirus* (MeHV-1) (Witter *et al*, 1970). Cependant, durant les années 1970, l'efficacité du vaccin monovalent HVT a diminué due à l'apparition de souches hyper virulentes engendrant ainsi des échappements à la vaccination. En 1980, un nouveau vaccin bivalent a été introduit, ce dernier est composé du HVT avec la souche de sérotype 2 SB-1 ou la souche CVI988. L'augmentation de la virulence des souches virales a poussé les chercheurs à créer un nouveau vaccin trivalent par atténuation de la souche CVI988 en combinaison avec les souches HVT et SB-1 (Rispen *et al*, 1972).

Actuellement, tous les poulets d'élevage du monde entier sont vaccinés contre le GaHV-2. Cette vaccination permet la protection des animaux contre les symptômes de la maladie et réduit la réplication du virus pathogène dans l'hôte. Toutefois, elle n'empêche pas la dissémination des souches virulentes dans l'environnement et l'évolution des virus vers des pathotypes de plus en plus virulents (Baigent *et al*, 2006).

2- Formes cliniques :

La pathologie associée à l'infection par le virus GaHV-2 est complexe, elle est influencée par différents facteurs incluant entre autre la génétique, le sexe et l'âge de l'hôte. Cependant, la virulence de la souche virale demeure un paramètre important car il est impliqué dans la sévérité des lésions (Biggs, 2004).

La maladie de Marek présente deux formes : la forme « classique » et la forme « aigue ». La forme « classique » commence après une longue période d'incubation (3-9 semaines) et elle est caractérisée par une infiltration des lymphocytes dans les nerfs périphériques ce qui induit principalement des difficultés respiratoires, de la rétention fécale et des ailes pendantes (Stik, 2012). La mort de l'animal infecté est une conséquence de sa paralysie qui l'empêche de se nourrir et non pas directement du virus (Coupeau, 2009). La forme « aigue » de la maladie est causée par

des souches hyper virulentes (VV) du virus GaHV-2. Dans ce cas, l'évolution de la maladie est plus rapide et elle induit la mort de l'animal à partir de la quatrième semaine après l'infection.

3- Physiopathologie virale :

Le cycle viral du virus GaHV-2 est constitué de quatre phases consécutives qui sont : la phase productive précoce, la phase de latence, la phase productive tardive et enfin la phase tumorale (*Figure 1*).

Le virus GaHV-2 commence son cycle viral par la phase productive précoce. Durant cette phase, le GaHV-2 pénètre l'organisme par les voies respiratoires où il est phagocyté par les macrophages ou par les cellules dendritiques pulmonaires (Barrow *et al*, 2003). Ces cellules immunitaires vont permettre le transport du virus vers les organes lymphoïdes qui sont : la rate, le thymus et la bourse de Fabricius (Calnek 2001). Entre les 3^{ème} et 6^{ème} jours pi (post infection), la propagation dans les organes lymphoïdes se fait de cellule en cellule sans production de virions libres. Les lymphocytes B sont les principales cellules infectées par le virus. Toutefois, les macrophages et les lymphocytes T peuvent être la cible de l'infection par GaHV-2 (Shek *et al*, 1983 ., Barrow *et al*, 2003).

Entre les 6^{ème} et 7^{ème} jours pi, une phase de latence se met en place principalement dans les lymphocytes T CD4+ et dans une moindre mesure les lymphocytes B et T CD8+ (Shek *et al*, 1983 ., Baigent & Nair, 2004). Durant cette phase, GaHV-2 s'intègre au niveau des séquences télomériques des chromosomes de l'hôte (Delecluse & Hammerschmidt, 1993) et aucune protéine structurale n'est exprimée à l'exception de quelques gènes viraux transcrits dont le Latency-Associated Transcript (*LAT*) (Cantello *et al*. 1994), l'onco-protéine *meq* (Chang *et al*, 2005) et quelques microRNA (miRs) (Morgan *et al*, 2001 ., Luo *et al*, 2011) mais également des facteurs de signalisation cellulaire tels que les cytokines (IL-6, IL-8 et IFN- γ) et l'oxyde nitrique (NO), permettant ainsi l'établissement de la latence chez le poulet (Kaiser *et al*, 2003).

Tout au long de la phase de latence, quelques lymphocytes T sont réactivés pour atteindre la seconde phase productive à partir de la 2^{ème} à la 3^{ème} semaine pi. À partir de la 3^{ème} semaine, le GaHV-2 est transporté vers la peau et commence la réplication dans les cellules kératinocytaires des follicules plumeux (Baigent & Nair, 2004). Ces follicules infectés vont ensuite tomber dans l'environnement et deviennent la source d'infection d'autres poulets par une dissémination horizontale (Calnek *et al*, 1970). Finalement, la phase tumorale est caractérisée par une transformation néoplasique des lymphocytes T infectés de manière latente. Ces lymphocytes T transformés sont à l'origine des lymphomes T qui sont principalement localisés dans les organes viscéraux (rate, foie, gonades, reins et pro ventricules), les nerfs périphériques, la peau et les muscles. De plus, les lymphocytes T CD4+ infectés expriment un taux élevé du marqueur CD30. Par conséquent, MD peut être utilisé comme un modèle d'étude des lymphomes CD30 tel que le lymphome Hodgkinien chez l'humain (Burgess, 2004). Par ailleurs, il faut noter que la dernière phase du cycle viral s'accompagne d'une immunosuppression de type humorale et cellulaire pouvant aboutir à une infection létale par un autre pathogène.

4- Le virus de la maladie de Marek :

4.1- Classification :

Autrefois, le GaHV-2 était associé au virus Epstein-Barr virus (EBV) parmi la sous-famille des *Gamma herpesvirinae*. Ceci est dû au fait de son tropisme pour les cellules hématopoïétiques et à sa capacité à transformer des lymphomes T. Après quelques années, le virus GaHV-2 a été reclassé

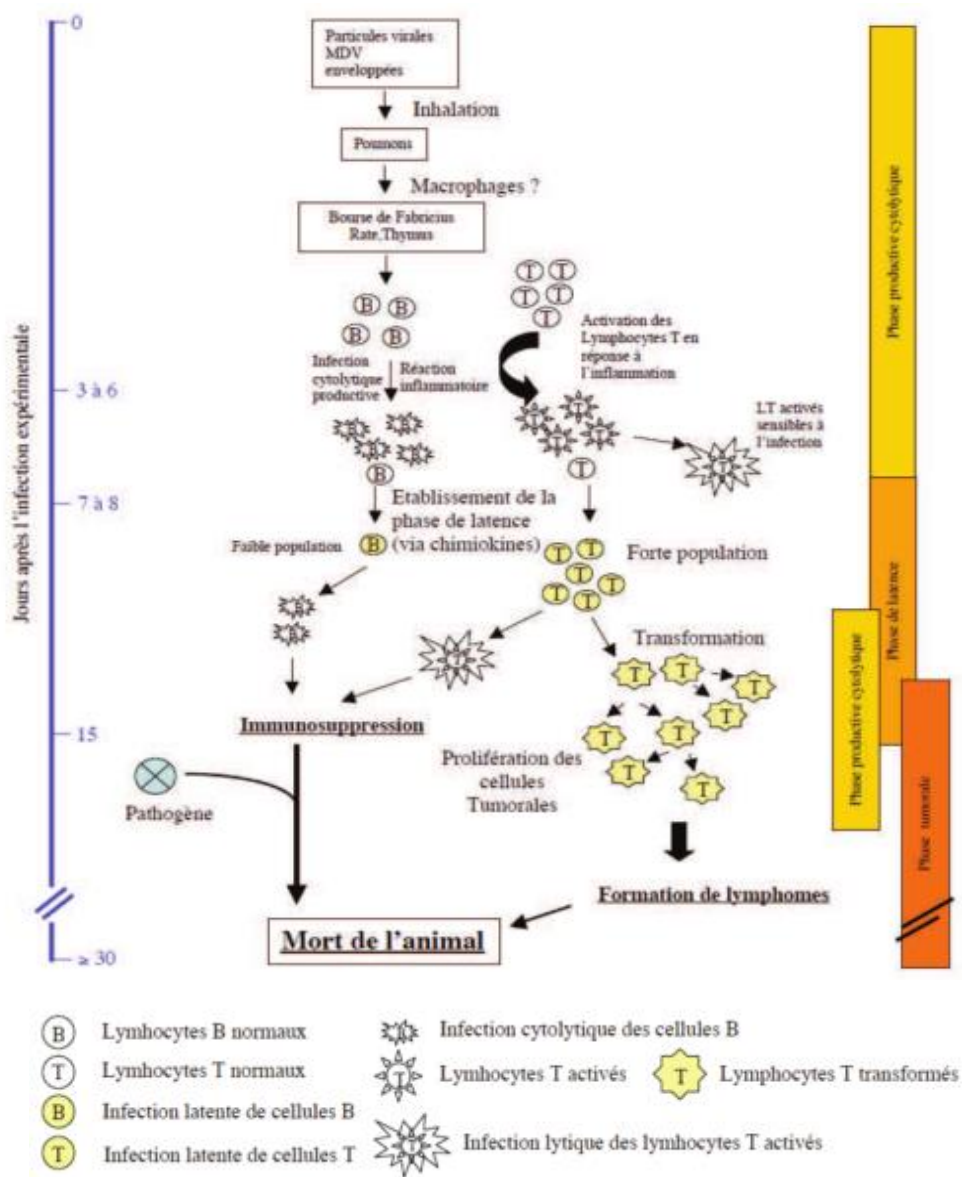


Figure 1 : Schéma représentant les différentes étapes du cycle viral de la souche oncogénique de GaHV-2 depuis son entrée dans les voies respiratoires de l'animal susceptible jusqu'à sa mort. Le cycle viral est constitué de quatre étapes : la phase productive précoce, la phase de latence, la phase productive tardive et enfin la phase tumorale (Coupeau, 2011).

parmi la sous famille des *Alphaherpesvirinae* après la mise en évidence de séquences répétées dans le génome du virus et qui sont caractéristiques de cette sous-classe.

Actuellement, le virus GaHV-2 fait partie de l'ordre des *Herpesvirales*, de la famille des *Herpesviridae*, de la sous-famille des *Alphaherpesvirinae* et du genre *Mardivirus* (Tableau. 1).

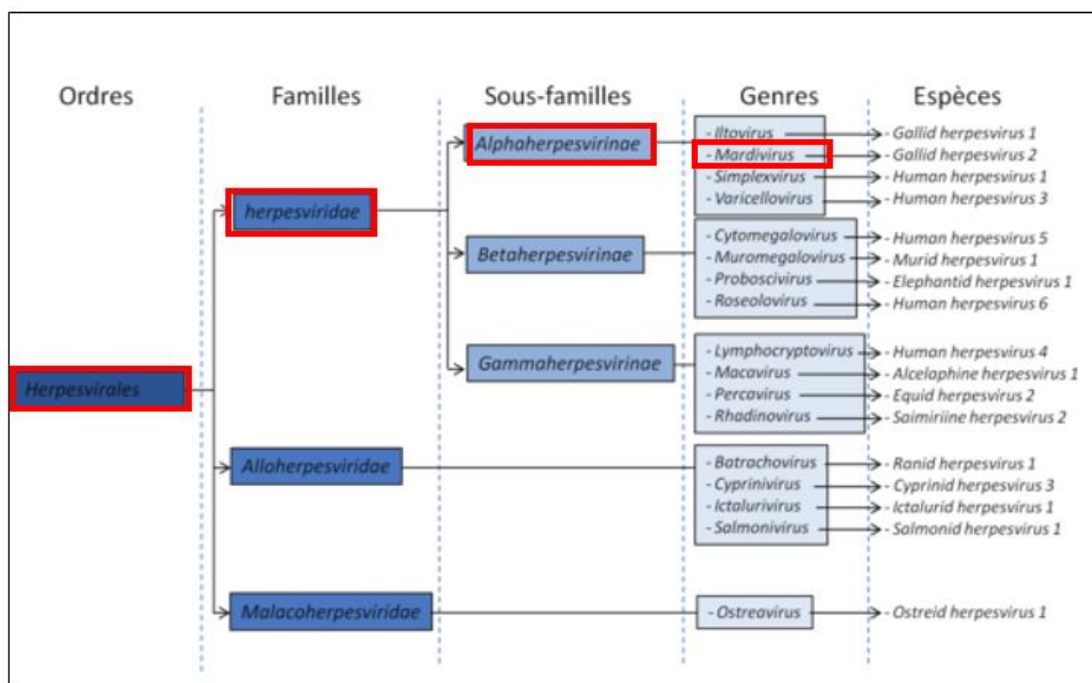


Tableau 1 : Représentation de la classification de l'ordre des herpesvirales. La classification du virus GaHV-2 est encadrée en rouge (Coupeau, 2011).

La sous-famille des *Alphaherpesvirinae* comprend le GaHV-2 mais aussi les virus d'*Herpès simplex* humains (Human herpesvirus 1) et le virus de la varicelle (Human herpesvirus 3) ainsi que les iltovirus (Gallid herpesvirus 1) (Tableau 1). Ces virus présentent des propriétés biologiques similaires c'est-à-dire que leur cycle réplcatif est court avec une destruction massive des cellules infectées. Le genre des *Mardivirus* se compose de trois génotypes qui sont : le génotype *Gallid herpesvirus* de type 2 (GaHV-2 anciennement MDV1), le génotype *Gallid Herpesvirus* type3 (GaHV-3 anciennement MDV2) et le génotype *Meleagrid herpesvirus* type 1 (MeHV-1 anciennement HVT). Le GaHV-2 rassemble les souches pathogènes et oncogènes, tandis que les génotypes GaHV-3 et MeHV-1 sont non pathogènes et non oncogènes (Tableau 2).

Tableau 2 : la classification du genre des Mardivirus (Stik, 2012).

Génotype	Pathotype	Oncogénicité	Souches
Gallid herpesvirus type 2 (GaHV2)	Hyper hypervirulent (vv+)	+++	RK1, 584A, 648A
	Hypervirulent (vv)	++	RB-1B, Md-5, Md-11
	Virulent (v)	+	GA, HPRS16, JM
	Faiblement virulent (m)	nulle	Rispens, Cu-2, HPRS17
Gallid herpesvirus 3 (GaHV3)	Faiblement virulent	nulle	SB-1, HPRS24, HN-1
Meleagrid herpesvirus type 1 (MeHV-1)	Faiblement virulent	nulle	HVT, WTHV, HPRS26

4.2- Structure du virus de la maladie de Marek:

La particule virale (*figure 2*) est composée d'une enveloppe lipidique externe avec des glycoprotéines ancrées, un tégument composé de plusieurs protéines et une capsidie icosaèdre constituée de 162 capsomères. Cette capsidie contient un génome d'ADN linéaire double brins d'environ 180 Kilo Paires de Bases (Kpb). Ce virus possède un génome de classe E défini par la présence de deux séquences uniques : une longue région unique (U_L) et une courte région unique (U_S), ces deux séquences sont flanquées respectivement par les répétitions identiques inverses Terminal/Internal Long Inverted Repeated sequences (TRL/IRL) et les Terminal/ Internal Short Inverted Repeated sequences (TRS/IRS).

Des séquences télomériques (GGGTTA) sont localisées dans la jonction des séquences IRL/IRS et sur l'extrémité du génome viral (Kishi et al, 1991). Des études ont montré que ces séquences sont impliquées dans l'intégration du génome viral dans les séquences télomériques du chromosome hôte durant la phase de latence (Delecluse & Hammerschmidt, 1993).

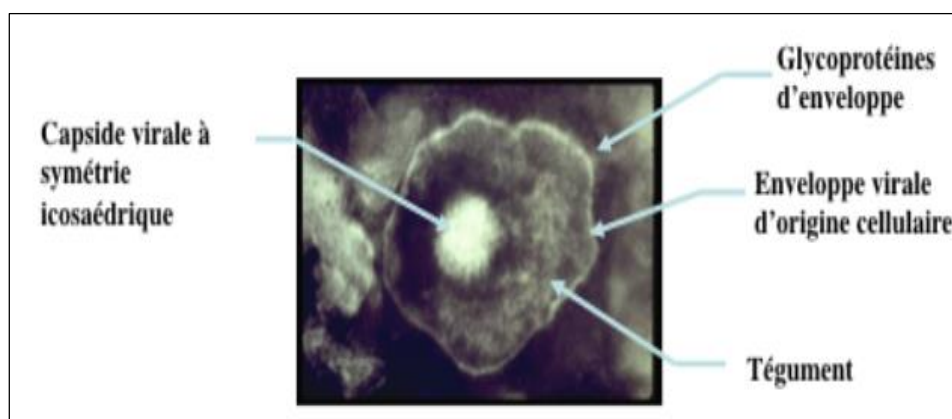


Figure 2 : micrographie électronique qui représente la particule virale du GaHV-2 (Cliché F. Coudert)

Durant le cycle viral, GaHV-2 induit des mécanismes pour la modification de l'expression des gènes cellulaires et viraux qui se déroulent aux niveaux transcriptionnel, post-transcriptionnel et post-traductionnel avec l'implication entre autre des modifications épigénétiques qui sont présentées dans l'introduction de ce mémoire.

II. La régulation épigénétique

Dans le noyau de la cellule eucaryote, l'ADN est toujours associé à des protéines pour former la chromatine. Celle-ci est constituée d'unités de bases nommées nucléosomes. Cette unité de base est composée d'un ADN de 150 pb entourant des protéines basiques (octamères). Les composants protéiques des octamères sont appelés histones. Chaque octamère est composé des histones H2A, H2B, H3 et H4 en deux copies chacun (Khorasanizadeh, 2004). Une autre histone qui est H1 intervient dans l'empaquetage des nucléosomes sur eux-mêmes pour former des fibres de chromatines de 300 nm pouvant générer soit des chromatines plus condensées appelées hétérochromatine ou bien de l'euchromatine qui contient les gènes activement transcrits. Il existe deux formes d'hétérochromatine : (i) - l'hétérochromatine constitutive qui est composée de séquences d'ADN non codantes telles que les séquences satellites, répétées qui se situent généralement dans les centromères. (ii) - l'hétérochromatine facultative est quant à elle, composée des régions de l'euchromatine qui se sont transformées en hétérochromatine. L'organisation de l'ADN en chromatine ainsi que l'état chromatinien sont impliqués dans la détermination des différentes fonctions du génome telles que la transcription, la réplication et la réparation de l'ADN en contrôlant l'accessibilité de l'ADN par les facteurs nucléaires (Felsenfeld & Groudine, 2003).

L'épigénétique est un changement réversible de l'activité du génome et qui est transmissible de génération en génération. Cette activité n'est pas le résultat d'une altération primaire de la séquence de l'ADN (Jaenisch & Bird, 2003). Les mécanismes épigénétiques génèrent soit des chromatines décondensées et transcriptionnellement actives, soit des chromatines condensées et transcriptionnellement inactives. L'épigénétique permet de réguler l'accessibilité de l'ADN aux facteurs nucléaires et de maintenir l'état d'activité de la chromatine. De plus, cette régulation est établie durant le développement, la différenciation cellulaire, le vieillissement, la réponse à des stimuli extérieurs et même pour la protection contre les gènes viraux intégrés dans le génome de la cellule (Jaenisch & Bird, 2003).

La modification de la structure de l'ADN lors de la régulation épigénétique peut se faire à différents niveaux : la méthylation de l'ADN lui-même et des modifications post-traductionnelles des histones (HPTMs) (Li, 2002 ; Narlikar *et al*, 2002; Khorasanizadeh, 2004).

1- Modifications post-traductionnelles des histones :

Ces modifications sont principalement : l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation, l'ubiquitinylation et la sumoylation. Toutefois, il existe une autre régulation des histones qui consiste à un remplacement des histones par des histones atypiques par exemple : la protéine centromérique A est une variante de l'histone H3 qui est responsable de l'assemblage des nucléosomes centromériques avec les autres histones (Palmer, 1991).

L'acétylation se fait par ajout d'un groupement acétyle au niveau de l'extrémité N-terminales des résidus lysine qui constituent les histones. Cet ajout permet la neutralisation de la charge positive de l'extrémité des histones et va relâcher l'ADN en diminuant l'interaction entre ADN-histones et entre les nucléosomes. Le niveau d'acétylation est assuré par les enzymes acétyltransférases des histones (HAT) qui rajoutent les groupements acétyles et les désacétylases d'histones (DHAT) qui enlèvent ces groupements. Ces enzymes sont localisés sur des sites spécifiques du promoteur pour permettre la régulation locale de la transcription des gènes. Les enzymes HAT induisent une augmentation du taux d'acétylation au niveau des promoteurs et induisent une forte expression des gènes en aval de ce dernier (Kuo *et al*, 2000). Par contre, les enzymes DHAT diminuent le taux

d'acétylation au niveau des promoteurs et sont généralement associés à la répression des gènes (Khochbin *et al*, 2001).

La méthylation des histones peut se faire sur leurs résidus arginine (R) ou lysine (K). La méthylation sur le résidu arginine des histones H3 et H4 est effectué par l'enzyme PRMT (protéine R méthyltransférases) et induit l'activation de la transcription (Barski *et al*, 2007). De plus, cette méthylation induit l'acétylation des histones (Wang *et al*, 2001). La méthylation des lysines est catalysé par les HKMT (méthyltransférase de lysine des histones) et elle s'effectue sur les lysines 3, 9 et 27 de l'histone H3 et la lysine 20 de l'histone H4. La méthylation peut induire l'activation ou la répression de la transcription selon la lysine concerné. Ainsi, la méthylation en H3-K4 induit l'activation et la méthylation en H3-K9 et H3-K27 induit la répression de la transcription (Barski *et al*, 2007).

Toutes les modifications post-traductionnelles des histones sont connectées entre elles, ce qui constitue un code nommé codes des histones (Jenuwein & Allis, 2001 ., Lacoste & Cote, 2003). Chaque combinaison des modifications induit un état chromatinien actif ou inactif.

2- Méthylation de l'ADN :

La méthylation de l'ADN est une modification épigénétique réversible de l'ADN. Cette dernière concerne principalement les di nucléotides CpG au niveau de la cytosine. De plus, la méthylation est plus représentée au niveau des domaines nommés ilots CpG qui se retrouvent principalement sur les promoteurs des gènes (*figure 3*). Un ilot CpG est définit comme une région d'au moins 200 paire de base (pb) avec un pourcentage en GC supérieur à 50% et un ratio de CpG observé/ attendu supérieur à 60%. La méthylation de l'ADN est générée et maintenue par trois enzymes de la famille méthyltransférase de l'ADN (DNMTs) nommé DNMT1, DNMT3a et DNMT 3b (Allis *et al*, 2006). Les DNMTs utilisent le S-adénosyl-méthionine comme substrat pour catalyser le transfert d'un groupement méthyl sur la cytosine avec formation de la 5-méthylcytosine (*figure 4*). La méthylation de l'ADN est associé à une répression de l'expression d'un gène spécifique. De plus, une méthylation aberrante de l'ADN se produit dans les cancers conduisant à la répression de gènes supresseurs de tumeurs (Bird, 2002 ; Jones & Baylin, 2002).

Figure 3: Les ilots CpG peuvent se trouver dans les régions de promotrices dans 50% des gènes. Ces ilots ne sont pas méthylés dans une cellule normale. Par contre, ces ilots sont hyperméthylé dans le cas de pathologie tel que le cancer et induit la répression de l'expression des gènes en aval de ces promoteurs (Chuang & Jones, 2007).

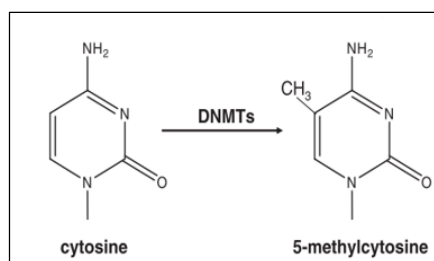
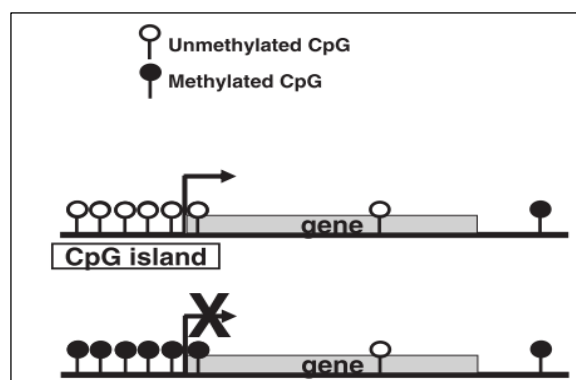
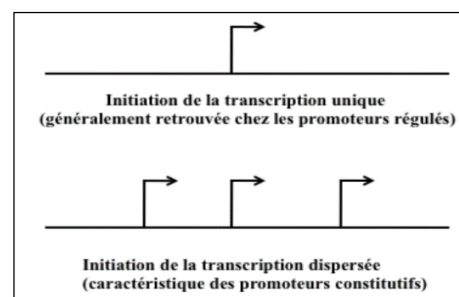


Figure 4: Schéma qui représente le mécanisme de la méthylation de l'ADN. Les enzymes DNMTs ajoutent un groupement méthyl en position 5 C sur le résidu cytosine. Cette méthylation est observé dans les di nucléotides CpG (Chuang & Jones, 2007).

III. Initiation de la transcription et « core » promoteur

Dans une cellule eucaryote, la transcription de l'ADN en acide ribonucléique messager (ARNm) est réalisée par trois types d'ARN polymérase dont ARN polymérase II (l'ARN poly II), qui est responsable de la transcription des gènes codant pour des protéines et certains miRs. L'accessibilité des gènes et de leurs promoteurs est un élément important lors de la transcription car ceci va permettre la fixation de facteurs de transcription et de cofacteurs sur une partie du promoteur appelée « core » promoteur et ainsi démarrer la transcription. L'initiation de la transcription peut être unique ou dispersée (*figure 5*). Dans le cas d'une initiation unique, la transcription démarre à partir d'un site d'initiation unique localisé sur un nucléotide précis nommé le TSS (transcription start site) tandis que dans l'initiation dispersée, la transcription peut démarrer à partir de plusieurs sites d'initiation dans une séquence de 50 à 100 pb (Smale & Kadonaga, 2003; Carninci *et al*, 2006). Par ailleurs, il est établi que les gènes régulés possèdent un promoteur à initiation unique et les gènes constitutifs, un promoteur à initiation dispersée.

Figure 5: Schéma représentant les promoteurs à initiation unique et à initiation dispersée (Stik, 2012).



Le « core » promoteur est situé en position 5' du gène. De plus, il possède des structures et des fonctions très variées selon le type d'élément qui le compose. Comme mentionné précédemment, la transcription d'un gène cellulaire en ARNm requière l'ARN poly II ainsi que d'autres facteurs transcriptionnel basaux qui peuvent eux-même reconnaître le promoteur tels que le facteur Transcription Factor for RNA polymerase II (TFIIA, TFIIB, TFIIF, TFIIE, TFIIH et TFIID) (Conaway & Conaway, 1997).

L'initiation de la transcription de type TATA dépendante est bien caractérisée. Elle implique des éléments cis-régulateurs qui sont des séquences d'ADN spécifiques et des éléments trans-régulateurs qui sont les facteurs de transcription. Les éléments cis-régulateurs (*figure 6*) sont composé tout d'abord de la boîte TATA qui est définie comme un motif nucléotidique du promoteur et se situe à environ 30 nt en amont du TSS. Cette boîte va permettre la fixation de la protéine TATA binding protein (TBP). Toutefois, chez les mammifères la boîte TATA n'est présente que dans 10 à 15% des promoteurs (Carninci *et al*. 2006). Le « core » promoteur est aussi composé d'un motif dit TFIIB Recognition Element (BRE), situés de part et d'autre de la boîte TATA permettant la fixation du facteur de transcription TFIIB, ainsi que d'une séquence consensus YYANWYY nommé INR. Cette dernière représente le site d'initiation de la transcription où se fixe les facteurs TBP-associated factor 1 (TAF1) et TBP-associated factor 2 (TAF2) (Carninci *et al*, 2006). En aval de la séquence INR, se trouvent le motif Downstream core Promoter Element (DPE) et le motif Motif Ten Element (MTE) qui sont tous deux impliqués dans la fixation du facteur de transcription TFIID (Burke & Kadonaga, 1997). Il existe également des séquences appelés boîtes GC (pas présentés sur la *figure 6*) qui sont des séquences riches en di nucléotides GC. Elles sont situées entre 40 et 80 nt en amont du TSS. Ces boîtes vont permettre la fixation d'un facteur de transcription qui leur est spécifique

nommé specificity protein 1 (Sp1) (Blake *et al*, 1990). Il a été montré que le facteur Sp1 peut se lier au facteur TBP en absence de la boîte TATA (Butler & Kadonaga, 2002). Ces boîtes GC sont retrouvées dans 50% des promoteurs humains sans la boîte TATA et elles semblent induire des initiations dispersées de la transcription. Chez l'homme, seulement 24 % des promoteurs contiennent une boîte TATA et seulement 10 % d'entre elles présentent une séquence consensus. Le motif INR est présent dans la moitié des promoteurs, alors que 46% des promoteurs sont dépourvus à la fois de boîte TATA et d'INR (Yang *et al*, 2007). Enfin, les trois quarts des promoteurs dépourvus de boîte TATA contiennent plusieurs boîtes GC (Yang *et al*, 2007) qui induisent le plus souvent des initiations dispersées de la transcription.



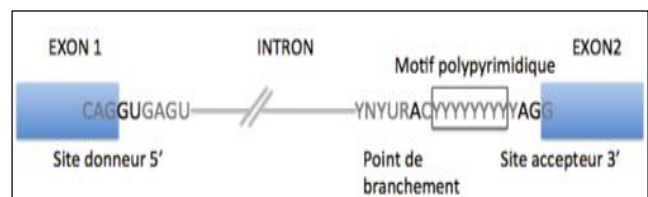
Figure.6: Schéma représentant les éléments cis-régulateurs situés sur le « core » promoteur et impliqués à l'initiation unique de la transcription par l'ARN poly II. La flèche +1 représente le site d'initiation de la transcription (TSS) (Juven-Gershon & Kadonaga, 2010).

IV. Le mécanisme d'épissage

Généralement, après l'étape de la transcription du gène par l'ARN poly II, l'ARNm généré subit plusieurs étapes de régulation co-transcriptionnelle nécessaire à sa maturation qui sont l'addition de la coiffe en 5', l'épissage des introns, l'addition de la queue poly A en 3' et l'édition de l'ARNm (Bentley, 2002).

Les gènes sont composés d'exons et d'introns. Les exons représentent la partie du messager primaire qui sera conservée après sa sortie du noyau et les introns, la séquence qui est retenue et éliminée dans le noyau. Le mécanisme d'épissage constitutif consiste en l'excision des introns et le reliage entre les exons (*figure 7*). Des études ont permis de définir les limites intron/exon grâce à des séquences consensus (breathnach *et al*, 1978) qui semble être communes chez les vertébrés, plantes et levures (padgett *et al*, 1986). En effet, au niveau de la partie 5' de l'intron il y a le site donneur d'épissage (GU) et dans sa partie 3' il y a le site accepteur (AG) avec un point de branchement (A) et un motif polypyrimidique (yyyyyy).

Figure.7: Schéma représentant la structure d'un ARNm avant sa maturation et les motifs permettant la réaction d'épissage. La partie 5' de l'intron contient le site donneur (GU) et en 3' le site accepteur (AG), le point de branchement (A) et le motif polypyrimidique (encadré) (Thénoz, 2014).

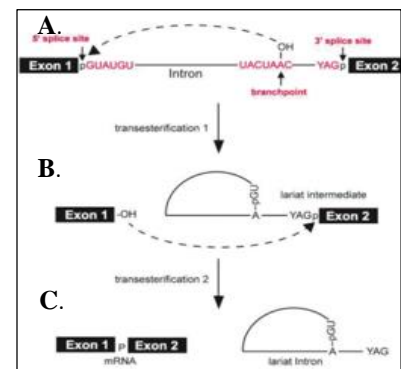


L'épissage alternatif est un mécanisme qui permet la production de plusieurs transcrits d'ARNm (isoformes transcriptionnelles) à partir d'un gène unique et de générer des isoformes de protéines avec des propriétés structurales et fonctionnelles différentes (Graveley, 2001). L'épissage alternatif concerne 95% des gènes humains et induit une variété au niveau transcriptomique, protéomiques ainsi qu'au niveau phénotypique de la cellule. De plus, différents épissages alternatifs entre individus de la même espèce ont été montrés (Hull *et al*, 2007). Ces différences sont expliquées par la présence de polymorphisme d'un seul nucléotide au sein de l'ADN nommé single nucleotide polymorphism (SNP) (Hull *et al*, 2007). Outre le rôle de l'épissage alternatif dans les modifications

structurales de protéines générées, ce mécanisme permet la régulation quantitative des ARNm produit. En effet, l'épissage alternatif régule l'expression génique dans la cellule en produisant des transcrits qui vont être pris en charge par le système de dégradation des ARN non-sens (ARN avec un codon stop prématuré)(Green *et al*, 2003) nommé nonsense mediated RNAm decay (NMD) (Huang & Wilkinson, 2012) ou bien s'échapper à la liaison aux miRs.

L'épissage de l'ARNm est catalysé par un complexe ribonucléoprotéique nommé spliceosome. Ce dernier est majoritairement constitué par le small nuclear ribonucleo protein (snRNP). Il existe deux types de spliceosome : le spliceosome majeur dans les cellules eucaryotes dit de type U2 et le spliceosome mineur de type U12. Ce dernier ne concerne que 1% des gènes humains (Levine & Durbin, 2001 D). Le mécanisme d'épissage de l'ARNm par le spliceosome se résume en deux réactions de trans-estérification (*figure 8*). Tout d'abord, une attaque nucléophile sur le site d'épissage 5' est réalisée par le groupe 2' OH (hydroxyle) de l'adénosine du point de branchement et forment une liaison phosphodiester entre les deux (*figure 8.A*). Ensuite, une deuxième liaison phosphodiester est établie entre l'extrémité 3' OH de l'exon et le site d'épissage 3' (*figure 8.B*). Finalement, l'intron est libéré en forme de lasso et les deux exons se lient entre eux ce qui va induire la dissociation des composants du spliceosome (*figure 8.C*).

Figure 8: Schéma représentant les deux réactions de trans-estérification permettant l'excision de l'intron et sa libération sous forme de lariat et la jonction entre les deux exons (Chen & Cheng, 2012)



Il existe cinq types d'épissage alternatifs (*figure 9*) qui sont les suivants : **A-** L'épissage de type cassette qui se traduit par l'inclusion ou l'exclusion d'un exon alternatif (exon qui peut être épissé avec les introns) situé entre exons constitutifs (exon qui se trouve toujours dans l'ARNm). **B-** l'épissage de type multi-cassette (mutuellement exclusif) est le cas où deux exons alternatifs exclusifs l'un de l'autre se situent entre deux exons constitutifs donc le complexe d'épissage choisit lequel des deux sera inclus ou exclu dans l'ARNm. **C-** l'épissage via des sites cryptiques en 5' ou **D-** l'épissage via des sites cryptiques en 3' qui induisent tous les deux l'élimination d'une partie d'un exon ou bien la conservation d'une partie d'un intron. **E-** la rétention d'un intron dans l'ARNm grâce à l'absence d'épissage.

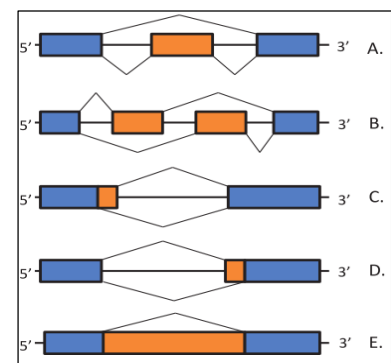


Figure 9: Schéma représentant les cinq types d'épissage alternatifs. A. Epissage de type cassette. B. Epissage de type multi-cassette. C. Epissage via des sites cryptiques en 3'. D. Epissage via des sites cryptiques en 5'. E. Rétention d'intron. Les exons constitutifs sont en bleu et les exons alternatifs en orange (Coupeau, 2011).

Il existe un autre mécanisme capable de générer des isoformes transcriptionnelles appelé : la polyadénylation alternative au niveau de la partie 3' terminale de l'ARNm. Ce mécanisme concerne 70% des gènes humains (Shi, 2012) et implique plusieurs choix de sites poly A et par conséquent

des ARNm de différentes tailles au niveau de leurs partie 3' untranslated region (UTR). Des études ont montré que ce mécanisme est important dans la stabilité de l'ARNm dans la cellule en contrôlant le nombre des séquences cibles des miRs (expliqué dans le chapitre suivant) et qui se trouve généralement dans la partie 3' UTR de l'ARNm. Un exemple intéressant est celui des cellules T ; Sandberg *et al* ont montré que le choix de queue poly A est différent dans les cellules T en prolifération (3' UTR courte) en comparaison avec les cellules T quiescentes (3' UTR longue) (Sandberg *et al*, 2008). Un autre exemple est l'étude de Mayr et Bartel, qui ont montré un raccourcissement des parties 3'UTR de proto-oncogènes dans 27 lignées cancéreuses comparées aux contrôles. Ceci engendrerait l'échappement de ces ARNm à la liaison aux miRs et ainsi permettrait la production accrue de proto-oncogènes (Mayr & Bartel, 2009).

V. Les microARNs

Les microARNs (ou miRs) sont de courtes séquences d'ARN simple brin non codant de 21 à 23 nucléotides (nt), cette séquence est dépourvue de queue poly(A) en 3' et de coiffe protectrice en 5'. Ces miRs assurent la régulation de l'expression des gènes en ciblant les ARNm. Ils induisent soit la dégradation, par déadénylation ou en inhibant sa traduction dans le cas où la complémentarité est imparfaite entre le miR et l'ARNm, soit le clivage de l'ARNm au niveau de leurs interactions si la complémentarité est parfaite. Il a été aussi reporté que les miRs peuvent agir au niveau nucléaire et induire l'expression ou la répression des gènes en se liant sur leurs promoteurs (Zardo *et al*, 2012). Le miR mature dérive d'un long transcrit primaire (pri-miARN) qui subit plusieurs étapes de maturation par deux endoribonucléases III : la Drosha nucléaire qui clive le pri-miR et génère un miR précurseur (pré-miR) d'environ 70 nt, et le Dicer qui prend en charge le pré-miR dans le cytoplasme et génère un duplexe miR d'environ 22 nt. Le transport du pré-miR du noyau vers le cytoplasme est assuré par la protéine exportine-5. La dernière étape de la maturation consiste en l'association de l'un des deux brins du duplex miR avec le complexe RNA-induced silencing complex (RISC) et la protéine argonaute, cette étape va permettre au miR mature d'acquérir son pouvoir d'interférence (*figure 10*).

1- Localisation génomique des transcrits contenant les miRs:

En 2004, une étude a été réalisée sur l'annotation des positions des gènes codant les miRs des mammifères dans le génome de l'humain et de la souris (*figure 11*). Cette étude a démontré que plus de 50% des miRs mammaliens connus proviennent d'introns localisés dans des unités transcriptionnelles. Cette dernière pouvant être soit codante (*figure 11.d*) soit non codante (*figure 11.c*) pour des protéines. De plus, les gènes hôtes codant pour des protéines sont impliqués dans différents rôles biologiques tels que : le développement embryonnaire, le cycle cellulaire et la physiologie cellulaire ou encore impliqués dans certaines pathologies humaines (Rodriguez *et al*, 2004). D'autre part, 10% des séquences codantes pour des miRs se trouvent dans des exons d'un long transcrit non codant pour des protéines (*figure 11.a*). Dans ce cas, ces pri-miRs possèdent leurs propres promoteurs et signaux de terminaison. Il existe de rares cas où le miR provient de la région 3' UTR d'un ARNm codant (*figure 11.e*). Chez les mammifères, 30 à 50% des miRs sont organisés en cluster (*figure 11.b*) (Rodriguez *et al*, 2004). En effet, ces miRs sont transcrits en un seul pri-miR qui va donner après sa maturation plusieurs miRs matures (Cely, 2014).

Il existe des petites séquences codantes pour des miRs qui s'appellent « mirtrons ». Ces séquences se trouvent dans de courts introns encadrés par des exons dans des régions codantes pour des protéines. Le processus de maturation de ces mirtrons ne nécessite pas l'intervention de l'enzyme

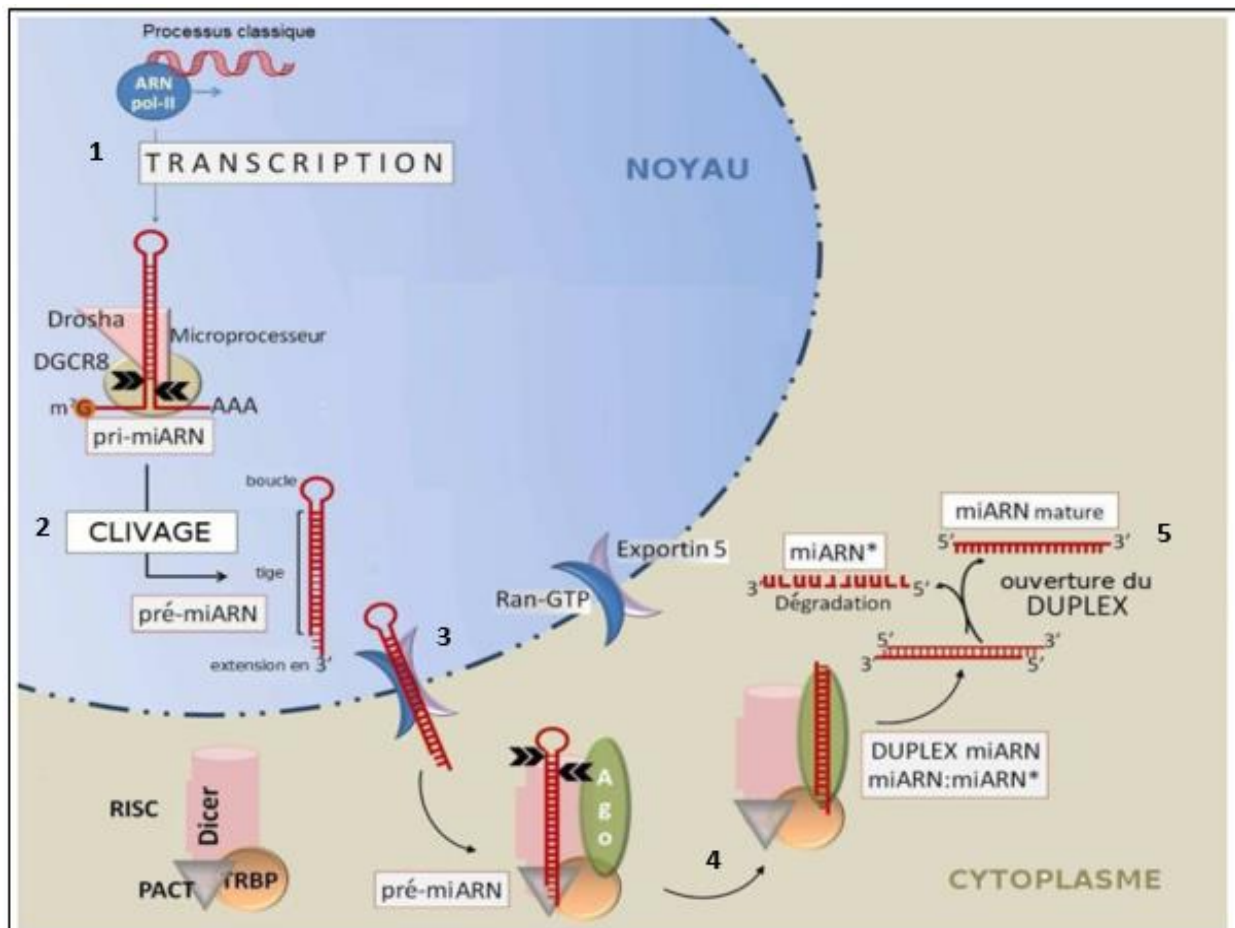


Figure 10 : Schéma qui résume la biogenèse des miRs canoniques. Le gène codant le miR est transcrit par l'ARN poly II dans le noyau (1). Le pri-miR est clivé par le complexe Drosha et génère un pré-miR d'environ 70 nt (2) qui quitte le noyau vers le cytoplasme via l'exportine 5 (3), ensuite le complexe Dicer prend en charge le pré-miR dans le cytoplasme et génère un duplexe de miR d'environ 22 nt (4). Enfin, un seul brin du duplexe de miR s'associe avec le complexe RISC et la protéine argonaute (5). La formation de ce complexe va induire la répression post-transcriptionnelle soit par le clivage de l'ARNm, soit par l'inhibition de la traduction et/ou la dégradation de l'ARNm (Sotillo & Thomas-Tikhonenko, 2011).

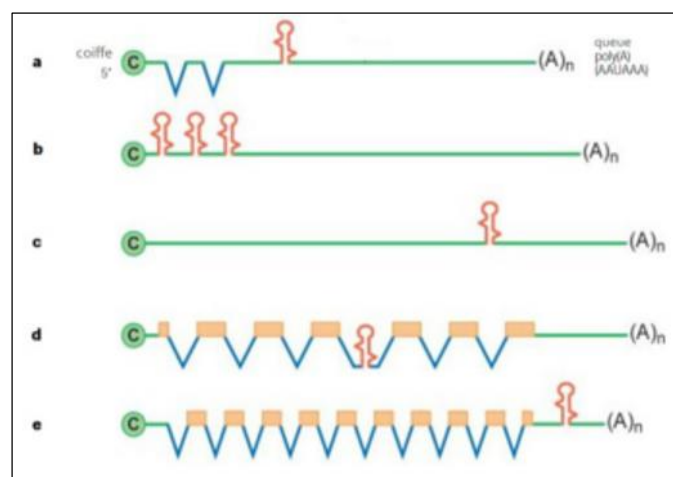


Figure 11: Schéma représentant la localisation génomique des miRs. Le miR exonique d'un ARN non codant (a). Le cluster de miR dans une région non codante (b). Le miR isolé dans une région non codante (c). Le miR intronique d'un ARN codant (d). Le miR provient d'un exon de la région 3'UTR d'ARN codant (e). La tige-boucle du pré-miR est représentée en rouge, les séquences non codantes en vert, les introns en bleu et les exons codants en beige (Cullen, 2004).

Drosha car les extrémités de la structure tige boucle du pré-miR correspondent aux bornes d'épissage de l'intron par le spliceosome (Okamura *et al*, 2007).

2- Transcription des miRs:

Il est généralement accepté que le pri-miR est transcrit dans le noyau par une ARN poly II (Lee *et al*, 2003). Cependant, Une étude a montré que les miRs introniques possédaient en amont de leurs séquences génomiques, des éléments régulateurs qui correspondaient aux promoteurs de l'ARN poly II ou des séquences régulatrices de l'ARN poly III. La présence de ces promoteurs peut induire la transcription de ces miRs intronique indépendamment de leurs gènes hôte. De plus, certains miRs introniques peuvent être transcrits à partir du promoteur hôte et à partir de leurs propres promoteurs comme dans le cas pathologique de la leucémie lymphoblastique, où le miR intronique 182-2 (miR-182-2) semble être surexprimé et régulé à la fois par le promoteur de son gène hôte via l'ARN poly II et par son propre promoteur via l'ARN poly III. La transcription par l'ARN poly III est due à une inactivation de son répresseur P53 (Monteys *et al*, 2010). Cette étude indique que l'expression des miRs est complexe et dépend fortement du type cellulaire et de l'état sain ou pathologique de la cellule.

3- Processus de maturation des miRs :

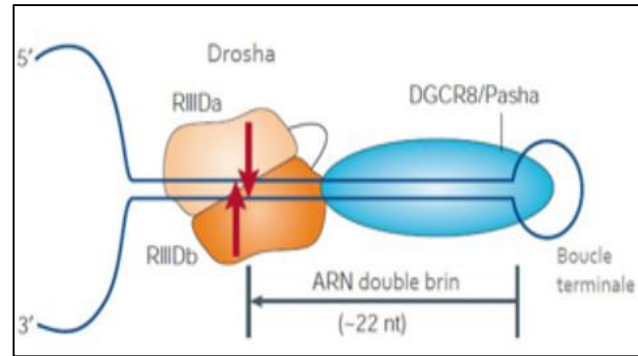
Actuellement, il existe deux voies alternatives de maturation des pri-miRs chez les animaux : La voie canonique qui fait intervenir le complexe Drosha/DGCR8 et la voie minoritaire qui utilise la machinerie d'épissage. Dans ce dernier cas, la maturation du pri-miR est dérivée des ARN de transfert (ARNt), des Small nucleolar RNA (snoARN), des Small hairpin RNA (shARN) ou enfin des mirtrons (Miyoshi *et al*, 2010).

3.1- Production du pré-miR par la voie de maturation canonique :

La maturation du pri-miR nécessite la présence de la structure tige-boucle. Cette structure secondaire est reconnue et clivé par un complexe qui s'appelle le microprocesseur. Ce complexe est composé de l'ARNase III Drosha et de son cofacteur DiGeorge syndrome critical region 8 (DGCR8) chez l'humain et Pasha chez les invertébrés.

Drosha est une protéine conservée de 160 KDa. Celle-ci possède deux domaines ARNase III et un domaine de liaison à l'ARN double brin double-stranded RNA-binding domain (dsRBD). Le cofacteur qui fait environ 120 KDa semble être important pour la reconnaissance de Drosha de son substrat, la fixation et la bonne conformation du pri-miR (Yeom *et al*, 2006). À ce microprocesseur s'ajoutent d'autres protéines telles que : les hélicases DDX15 (p68) et DDX17 (p72) qui favorisent la maturation du pri-miR en pré-miR (Fukuda *et al*, 2007) et la protéine KH-type Splicing Regulatory Protein (KSRP) qui facilite la maturation de quelques pri-miRs par Drosha en reconnaissant des triplets « GGG » dans la région de la boucle (Trabucchi *et al*, 2009). De plus, il a été montré qu'il existe des facteurs tels que le complexe NF45-NF90 pouvant réguler négativement la maturation de certains pri-miRs en empêchant la liaison de ce dernier avec le microprocesseur (Sakamoto *et al*, 2009). Le site de clivage de ce microprocesseur est déterminé par la distance qui le sépare de la jonction tige-boucle et qui correspond à 22 nt (*figure 12*). Le produit de cette maturation est un ARN double brin en structure tige boucle d'environ 70 nt qui s'appelle le pré-miR. Celui-ci possède une extrémité 3' saillantes de 2nt et une extrémité 5' phosphorylée (Okada *et al*, 2009 ; Stik, 2012).

Figure 12 : Schéma représentant le clivage par le complexe Drosha. La tige boucle en bleu représente le pri-miR, les flèches rouges représentent le site du clivage du complexe (Kim, 2005).



3.2- Transport du pré-miR vers le cytoplasme et maturation du pré-miR :

La prochaine étape de la maturation a lieu dans le cytoplasme. Le transport du pré-miR du noyau vers le cytoplasme se fait par le biais d'un récepteur de transport nucléaire nommé l'exportine-5. Ce complexe se lie avec une GTPase nommée RAS-related Nuclear protein (RAN). Le pré-miR est reconnu par l'exportine-5 grâce à sa structure tige et l'extension de 2 nt à son extrémité 3' (Zeng & Cullen, 2004). La libération du pré-miR dans le cytoplasme se fait par hydrolyse du GTP en GDP. Une fois dans le cytoplasme, le pré-miR est pris en charge par une autre RNaseIII nommé Dicer en association avec ses cofacteurs qui vont produire ensemble un duplex (miR5p-miR3p) d'environ 22nt.

Dicer est une protéine de 200 KDa, conservée chez les différentes espèces (organismes eucaryotes, plantes et animaux). Cette protéine se compose de deux domaines RNAase III et un domaine de liaison à l'ARN double brins. Dicer se lie généralement à d'autres protéines telles que des protéines de la famille argonaute et les protéines de liaison à l'ARN double brin comme le : transactivation response RNA-binding protein (TRBP) et Protein Activator of PKR (PACT) (Kim *et al*, 2009). Dicer reconnaît le site de clivage du pré-miR par la distance qui le sépare de l'extrémité 3' du pré-miR et qui fait environ 22nt c'est-à-dire un tour d'hélice (figure13).

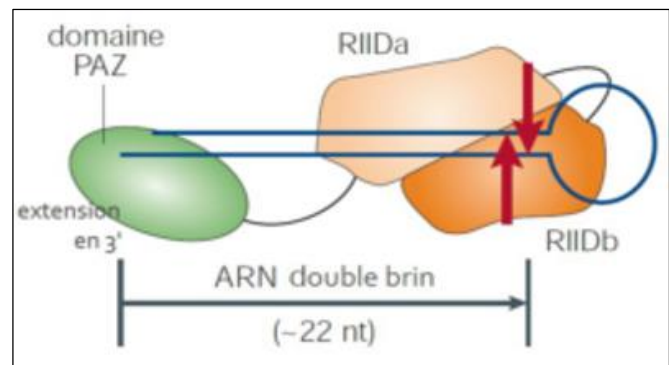


Figure 13 : Schéma représentant le clivage par le complexe Dicer. Les domaines RIIIDa et PAZ sont représentés avec le pri-miR en tige boucle bleue. Les flèches rouges représentent le site de clivage du complexe Dicer (Kim, 2005).

3.3- Sélection du brin guide :

Durant cette phase, il y a une sélection préférentielle d'un des deux brins du duplex qui se nomme le brin guide. Ce dernier étant complémentaire à un ARNm cible, va être incorporé au complexe miRISC (Sarnow et al, 2006). Le second brin nommé brin passager (miR*), va être libéré et dégradé.

Le miRISC est une famille de complexe ribonucléoprotéique qui se compose d'une des quatre protéines Argonaute (AGO-2), du brin guide du miR et de facteur GW 182. Le nom du facteur

GW182 dérive du poids moléculaire de la protéine et la présence de répétitions de glycine et tryptophane, de plus ce facteur semble être important pour les mécanismes d'interférence de l'ARN.

L'AGO-2 est composé de trois domaines importants qui sont les suivant : le domaine Piwi-Argonaute-Zwille (PAZ) qui reconnaît l'extrémité 3' saillante du miR, le domaine Middle (MID) qui se lie au phosphate en 5' des petits ARN et le domaine PIWI qui reconnaît l'extrémité 5' du miR (Peters & Meister, 2007). Chez l'humain, parmi les quatre types de protéines Argonaute (AGO 1-4), seule l'AGO-2 possède le domaine PIWI responsable du clivage de l'ARNm cible de par son activité RNAase H (Liu *et al*, 2004).

Il est admis que la stabilité thermodynamique des extrémités 5' du duplex joue un rôle dans le choix du brin fonctionnel. En effet, le brin qui contient une stabilité moindre à son extrémité 5' va être retenu. De plus, il a été montré que la sélection du brin guide peut se faire par la protéine AGO-2 qui se lie préférentiellement à une des extrémités 5' du duplex et facilite l'incorporation du complexe miRISC (Frank *et al*, 2010). Le ratio d'incorporation du brin guide ou du brin passager au complexe miRISC peut varier en fonction du type cellulaire, du stade du développement ou l'intervention de certaines protéines (Ro *et al*, 2007 ; Krol *et al*, 2010).

4- Interaction entre ARNm/miR :

Le miR mature est composé de deux régions distinctes sur sa séquence : la région appelée seed composée des bases 2 à 8, importante à la liaison avec l'ARNm cible et la région en 3' qui sert d'ancrage plus ou moins étendue. La partie seed est la portion la plus conservée des miRs chez les métazoaires (Lewis *et al*, 2003). Cependant, il existe des cas où l'hybridation entre le miR et l'ARNm est imparfaite avec la présence de boucles dans la partie centrale. Les appariements dits incomplets sont importants car cela permet à un seul miR de réguler plusieurs ARNm cibles (Cely, 2014).

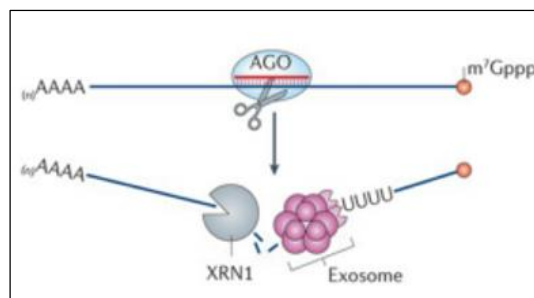
La cible du miR peut se situer sur la partie 3' UTR, 5' UTR ou même la partie codante de l'ARNm. Toutefois, chez l'homme les cibles au niveau 3' UTR sont plus abondante (Schnall-Levin *et al*, 2010).

5- Mécanismes régulés par le miR au niveau de l'ARNm :

5.1- Clivage de l'ARNm :

Dans le cas d'une hybridation parfaite entre les deux ARNs qui est majoritairement observé chez les plantes, l'ARNm cible est clivé au centre de l'appariement, grâce à l'activité RNase du complexe miRISC au niveau du domaine PIWI. Le clivage est réalisé entre les bases 11 et 12 du miR. Cela génère deux segments d'ARNm cibles : le premier avec une extrémité 5' phosphate et l'autre avec une extrémité 3' hydroxyle (OH). La dernière étape est la dégradation des deux fragments par deux exoribonucléases qui sont les suivantes : le complexe d'exosome qui dégrade l'ARN du sens 3'=>5' et la protéine XRN1 qui dégrade du sens 5'=>3' (figure14) (Ameres & Zamore, 2013).

Figure 14 : Schéma représentant la dégradation de l'ARNm après l'interaction avec le complexe miRISC. L'AGO-2 clive l'ARNm par l'activité RNase de son domaine PIWI, le clivage s'effectue entre les bases 10 et 11 du miR. Les fragments d'ARNm sont dégradés par l'exoribonucléase XRN1 (dans le sens 5'->3') et l'exosome (dans le sens 3'->5') (Ameres & Zamore, 2013)



La dégradation de l'ARNm cible peut se faire soit par la déadénylation de l'ARNm cible soit par suppression de la coiffe en 5'. La déadénylation consiste en la digestion de la queue poly (A) du coté 3' de l'ARNm par le recrutement du complexe Carbon Catabolite Repression 4 / Negative On TATA less 1 (CCR4/NOT1) qui comprend les déadénylases CCR4/CNOT6 et CAF1/CNOT7 suivi d'une dégradation par le complexe protéique exosome. En ce qui concerne la suppression de la coiffe du coté 5' de l'ARNm cible, deux complexes : decapping complex 1, 2 (DCP1 et DCP2) enlèvent la coiffe suivi d'une dégradation par l'exoribonucléase XRN1.

5.2- Blocage de la traduction de l'ARNm :

Dans le cas d'un appariement imparfait entre les deux ARNs qui est majoritairement observé chez les animaux, le miR soit inhibe au cours de la traduction ou bien, au niveau de l'initiation de la traduction de l'ARNm cible. Le catabolisme et le blocage de la traduction de l'ARNm est réalisé dans des corps cytoplasmiques appelés les P-bodies. De plus, les ARNm qui se trouvent dans ces corps sont soit stockés soit dégradés.

Inhibition de l'initiation de la traduction :

Le miR peut inhiber l'initiation de la traduction de l'ARNm soit à l'étape de la reconnaissance de la coiffe m7G ou à celle du recrutement de la sous-unité ribosomale 60S (Filipowicz *et al*, 2008). Dans le premier cas, une étude a montré que la protéine AGO-2 possède un domaine homologue du facteur de transcription eIF4E ce qui lui permet de se lier à la coiffe et ainsi empêcher la liaison de ce facteur et donc l'initiation de la traduction (Kiriakidou *et al*, 2007). Dans le deuxième cas, le complexe AGO-2, Dicer et le TRBP empêche la liaison de la sous unité 60S avec la sous unité 40S en induisant sa précipitation avec le facteur eIF6 (Chendrimada *et al*, 2007).

5.3- Activation de l'ARNm :

Plusieurs études ont montré que certains miRs pouvaient jouer un rôle d'activateurs de la traduction de leurs ARNm cibles mais sous certaines conditions. Ce mécanisme particulier a été montré dans une étude de Vasudevan *et al*, où les miRs réprimaient l'ARNm cible dans les cellules en phase de prolifération alors qu'une régulation positive était observée lorsque les cellules sont en repos grâce à l'association de la protéine AGO-2 avec une protéine nommée Fragile X Related Protein 1 (FXR1) (Vasudevan *et al*, 2007).

6- Régulation des miRs :

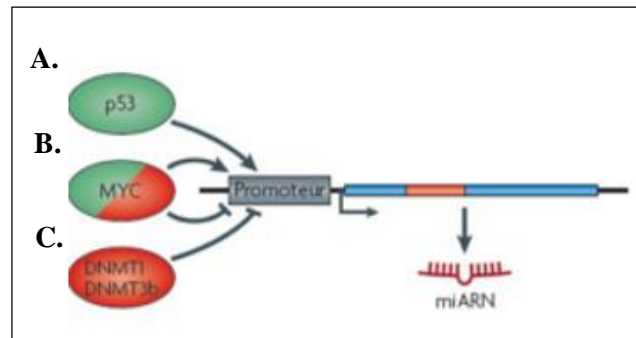
Comme mentionné précédemment, les miRs jouent un rôle important dans la régulation de l'expression génique dans les cellules. Cependant, une dérégulation de leur expression est observée dans de graves maladies telles que les cancers. De ce fait, les miRs sont soumis à une régulation fine aux niveaux des étapes de leurs biogenèses et leurs fonctionnements.

6.1- Régulation de la transcription des gènes de miRs :

La régulation des gènes à miRs se fait au niveau de l'ARN poly II ou III qui reconnaissent des sites comprenant des séquences promotrices spécifiques. Cette régulation va permettre l'expression des miRs selon le type cellulaire et le stade de développement. Les facteurs de transcription impliqués dans cette régulation peuvent jouer le rôle d'activateurs ou de répresseurs de la transcription. Quelques exemples sont montré ci-dessous (*figure15*) notamment les proto-oncogènes MYC et MYCN (*figure 15.A*) qui semblent induire l'expression de certains miRs dans les cellules cancéreuses tels que le cluster oncogénique miR-17-92 dans les cellules de lymphome (O'Donnell

et al, 2005). Par ailleurs, ces proto-oncogènes répriment l'expression de miRs qui ont un rôle de suppresseur de tumeurs tel que le miR-15a (Chang *et al*, 2008). Un autre exemple est celui du facteur p53 (*figure 15.B*) qui induit l'expression de miRs tels que le miR-34 et le miR-107 impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose (He *et al*, 2007). D'autres miRs tels que le miR-148a, miR-34b/c, miR-9 et let-7 peuvent être régulés selon le niveau de méthylation de leurs promoteurs par l'intervention des ADN méthyltransférases: DNMT1 et DNMT3b (*figure 15.C*) (Han *et al*, 2007).

Figure 15: Schéma représentant les FT (facteurs de transcriptions) activateurs et répresseurs de la transcription du miR. Ces FT régulent les gènes à s au niveau de leurs promoteurs. Les FT activateurs sont coloré en vert et les répresseurs en rouge. Il existe des FT qui peuvent être activateurs ou répresseur selon le miR qu'elle régule (Krol, 2010).



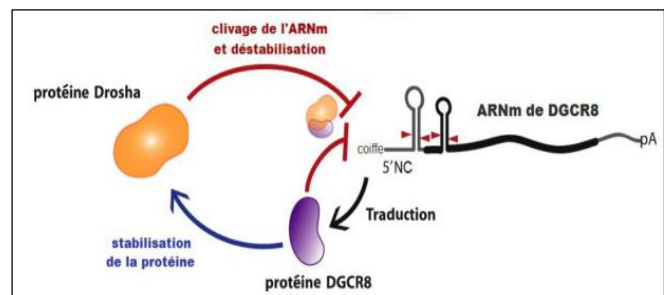
6.2- Boucles de rétrocontrôle de l'expression du miR :

Les miRs participent à la régulation de leur propre expression en s'impliquant dans des rétrocontrôles négatifs et en réprimant des ARNm qui codent pour des facteurs de transcription impliqués dans la régulation de la biogenèse ainsi que la fonction de ces mêmes miRs.

6.3- Régulation de la maturation des miRs :

La régulation du miR peut se faire au niveau de différentes étapes de maturation de ce dernier, ceci induit l'augmentation de la complexité de ce mode de régulation ainsi que le nombre de facteurs impliqués. La régulation peut se faire au niveau du clivage de la protéine Drosha (*figure16*). En effet, l'interaction de Drosha avec le DGCR8 va induire la stabilisation de cette dernière. De plus, Drosha régule le niveau d'expression de la protéine DGCR8 en clivant la structure en épingle à cheveux de son ARNm et ainsi induire la dégradation de DGCR8 (Han *et al*, 2009).

Figure 16: Schéma représentant la régulation de Drosha et le DGCR8. Drosha induit la déstabilisation de la protéine DGCR8 en clivant son ARNm. Tandis que la protéine DGCR8 régule positivement Drosha par des interactions protéine/protéine (Han, 2009).



Il a été décrit précédemment que la composition nucléotidique des extrémités 5' et 3' du miR mature est générée grâce au clivage successif de la protéine Drosha suivi de Dicer. Il arrive parfois que ce clivage génère des miRs isoformes qui diffèrent au niveau de leurs extrémités. Cette modification peut impliquer le changement de la cible du miR en modifiant la séquence seed (Krol *et al*, 2010). De plus, ce clivage non uniforme peut modifier le miR simple brin (miARN ou miARN*) qui sera pris en charge par le complexe miRISC.

VI. Rôles du miR-223 dans l'hématopoïèse normale, infection et l'inflammation

Tout d'abord, le miR-223 est spécifiquement exprimé dans les cellules hématopoïétiques avec une forte expression dans la lignée myéloïde et plus précisément les granulocytes dû à des facteurs myéloïdes durant leur différenciation. De plus, il est impliqué dans plusieurs boucles de rétrocontrôles afin d'assurer sa régulation dans les différents types cellulaires.

Une augmentation de l'expression de miR-223 a également été observée durant la différenciation des ostéoclastes, mégacaryocytes et les éosinophiles tandis qu'il diminue durant la différenciation des macrophages et des érythrocytes. En plus de l'implication du miR-223 dans la différenciation d'une grande variété de cellules immunitaires, il semble aussi influencer leurs patterns d'activation. À titre d'exemple, miR-223 module la polarisation des macrophages aussi bien que l'inflammasome et la voie de signalisation NF- κ B.

D'autres évidences suggèrent un rôle central du miR-223 dans le maintien de l'homéostasie dans différents types cellulaires du système immunitaire. Il semble aussi être très abondant dans les microvésicules qui circulent dans le sang périphérique, agissant comme un facteur homéostatique systémique. Toutes ces différentes fonctions accordées au miR-223 est lié au grand nombre de ces cibles (*Tableau 3*). Il faut noter que le tableau représente une liste non exhaustive des cibles de ce miR. L'existence d'une différence du niveau d'expression du miR-223 dans les différents types cellulaires durant la différenciation et l'activation cellulaire peut constituer un moyen de régulation de ces cibles dans les pathologies inflammatoires. Étant donné que le miR-223 est impliqué dans les fonctions cellulaires comme la prolifération et la survie, sa dérégulation est liée à plusieurs pathologies telles que les cancers, les désordres inflammatoires et les maladies infectieuses induites par les virus. Les études effectuées sur le rôle du miR-223 dans des cas physiologiques et pathologique ainsi que le détail des mécanismes impliquées dans la régulation de ce dernier sont détaillé ci-dessous.

Gène	Voie métabolique	Types cellulaires	Maladies		Référence
Artemin	Invasion/métastase	Lignée cellules du cancer de l'œsophage	Carcinome œsophagien	H	Li <i>et al</i> , 2011
C/EBP b	Prolifération/ différenciation	Érythro myéloblaste	Leucémie	H	Sun <i>et al</i> , 2010
E2F1	Cycle cellulaire	Blastes AML	AML	H	Pulikkan <i>et al</i> , 2010
EPB4 IL3	Métastases	Cellules cancéreuses	Cancer gastrique	H	Li.x <i>et al</i> , 2011
Fbxw7/Cdc4	Régulation du cycle cellulaire/ prolifération	Erythroblaste, cellules cancéreuse gastrique, carcinome cellulaire, squameuse œsophagienne	Leucémie, cancer gastrique, cellules du carcinome de la squameuse œsophagienne	H, S	Xu <i>et al</i> , 2010
FOXO1	Prolifération	Lignée de cellules cancéreuses	Cancer	H	Wu <i>et al</i> , 2012
Gag-pol	Latence du HIV	Cellules T CD4+	Infection par HIV	H	Huang <i>et al</i> , 2007
Granzyme β	Activation des cellules NK	Cellules NK	Inflammation	S	Fehniger <i>et al</i> , 2010
HSP90B1	Survie cellulaire	Lignée de cellules ostéosarcomes	Cancer	H	Li <i>et al</i> , 2012
IGF1R	Activation des neutrophiles, différenciation des éosinophiles, survie cellulaire	Neutrophiles, éosinophiles, cellules T-ALL, lignée de cellules cancéreuse	Inflammation, cancer	H, S	Johnnidis <i>et al</i> , 2008
IKKα	NF-κB	Monocytes	Inflammation	H	Li <i>et al</i> , 2010
LMO2	Différenciation des cellules érythroïdes et les mégacaryocytes	Cellules Progénitrices mégacaryocytes- érythroïdes	Leucémie/ lymphome	H	Sun <i>et al</i> , 2010
Mef2c	Prolifération des cellules progénitrices granulocytaires	Cellules progénitrices des granulocytes, cellules progénitrices des myéloïdes	Granulopoïèse, tumeur immunologique	S	Johnnidis <i>et al</i> , 2008
NFI-A	Différenciation des cellules myéloïdes	Progénitrices myéloïdes	Leucémie/ lymphome	H	Fazi <i>et al</i> , 2005
Promoteur NFI-A	Silencage épigénétique et la granulopoïèse	Progénitrices myéloïdes	Leucémie/ lymphome	H	Zardo <i>et al</i> , 2012
NLRP3	Inflammasome NLRP3	Monocyte/ macrophage	Inflammation	H, S	Haneklaus <i>et al</i> , 2012
PKnox1	Polarisation des macrophages	Macrophage	Inflammation du tissu adipeux	S	Zhuang <i>et al</i> , 2012
Rasa 1	Régulation du cycle cellulaire	Cellules HeLa	Cancer	H	Jia <i>et al</i> , 2011
RHOB	Remodelage du cytosquelette	Lignée des cellules cancéreuses	Cancer	H	Sun <i>et al</i> , 2010
Roquin	Production d'IL17A	Cellules Th17	Inflammation	S	Li <i>et al</i> , 2012
STAT3	NF-KB	Macrophage	Inflammation	S	Chen <i>et al</i> , 2012
STMN1	Dynamique des microtubules	Hépatocyte	HCC	H	Wong <i>et al</i> , 2008

Tableau 3: Tableau qui représente les cibles validées du miR-223 chez l'humain (H) et la souris (S) ainsi que les types cellulaires impliquées dans le cas pathologique ou normal (Haneklaus *et al*, 2013).

1- Rôle du miR-223 durant la granulopoïèse:

Il a été démontré par clonage des miRs provenant de la moelle osseuse de souris que le miR-223 est spécifiquement exprimé dans le système hématopoïétique (Chen et al, 2004). Plus précisément, le niveau d'expression du miR-223 est élevé dans les cellules de la lignée myéloïde avec une expression plus importante dans les granulocytes (Ramkissoo *et al*, 2006).

L'étude de Fukao *et al* a montré que l'induction de la différenciation de deux lignées leucémiques promyélocytaires (NB4 et HL60) était liée à l'augmentation de l'expression du miR-223. Cette expression est induite par deux facteurs de transcription myéloïdes nommés : PU.1 et CAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBP β) qui se lient au niveau du promoteur du miR-223 (Fukao *et al*, 2007). D'un autre côté, Fazi et al ont décrit un autre mécanisme par lequel le facteur nuclear factor I-A (NFI-A) maintenait un faible niveau d'expression du miR-223 dans les lignées NB4 et HL60 en se liant au promoteur de ce miR. Ce facteur semble rentrer en compétition avec le facteur de transcription CAAT/enhancer-binding protein alpha (C/EBP α) sur le site de liaison du promoteur du miR-223. En effet, l'induction de la différenciation de ces cellules progénitrices par le RA (acide rétinoïque), permet la liaison du facteur de transcription C/EBP α au promoteur du miR-223 à la place de NFI-A et ainsi, aboutit à l'augmentation de l'expression de ce miR dans les cellules (*figure 17*) (Fazi *et al*, 2005).

Zardo *et al* ont montré que le facteur de transcription NFI-A est une cible du miR-223 qui joue le rôle de régulateur négatif de sa transcription (*figure 18*). Il faut savoir que le facteur NFI-A est un régulateur de l'hématopoïèse car son taux d'expression détermine l'engagement des cellules human hematopoietic stem cells/ progenitor cells (HSCs/HPCs) vers la lignée érythropoïétique ou granulopoïétique. C'est-à-dire que durant la granulopoïèse, le facteur NFI-A subit des modifications épigénétiques au niveau des sites spécifiques de son promoteur nommés domaines bivalents. Ces modifications consistent en une combinaison d'activation des marqueurs histone 3 lysine 27 trimethylation (H3K27me3) et la répression des marqueurs histone 3 lysine 4 trimethylation (H3K4me3) pour aboutir à la formation d'une hétérochromatine. Cette régulation transcriptionnelle est induite d'un côté par le groupe des protéines polycombs (PcG) avec le miR-223 qui activent ensemble les marqueurs H3K27me3 et de l'autre côté le complexe trithorax qui réprime les marqueurs H3K4me3. Une analyse bio-informatique de la région de promoteur flanquant le site d'initiation de transcription du facteur NFI-A a révélé la présence du site de liaison de la protéine Yin Yang 1 (YY1). Il semblerait que l'association du miR-223 à sa séquence cible présente sur le promoteur du facteur NFI-A à proximité des sites de liaison de la protéine YY1 induit une réduction de la transcription du facteur NFI-A. De plus, l'association de ce miR à son site avec DICER1, YY1 et transitoirement avec AGO-1 est pertinente pour la granulopoïèse (Zardo *et al*, 2012). En effet, lorsque le miR-223 cible le facteur NFI-A au niveau de son promoteur, ceci va permettre la diminution de la prolifération des précurseurs myéloïdes et l'activation du facteur C/EBP α et ainsi initier le programme de différenciation (Fazi *et al*, 2005).

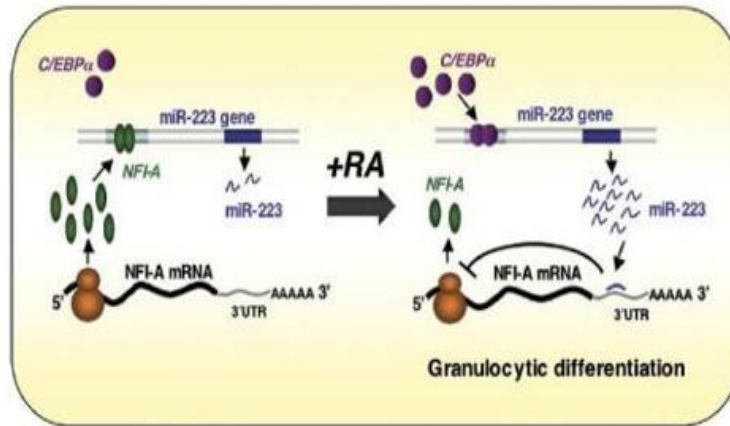
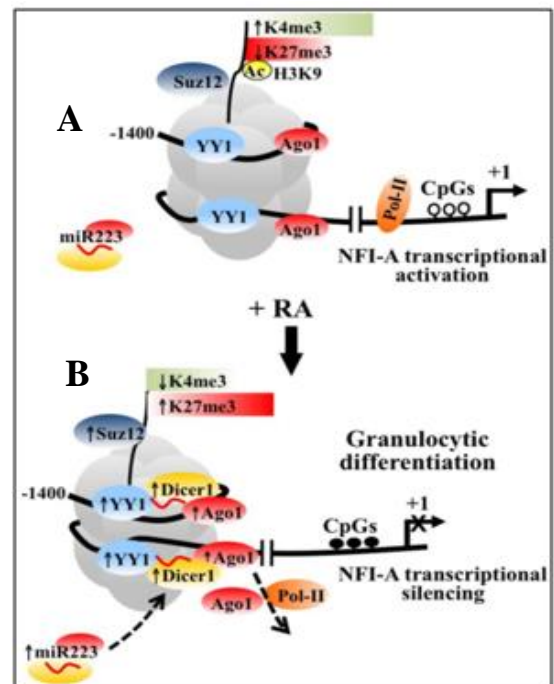


Figure 17 : Schéma représentant l'interaction entre miR-223, le facteur NFI-A et le facteur C/EBP α pour la différenciation des granulocytes. Dans le cas des cellules NB4 (cellules leucémiques promyélocyaires) indifférenciées, le facteur NFI-A se lie à une séquence du promoteur du miR-223 et induit la répression de son expression. Suite à la stimulation des cellules NB4 par le RA (acide rétinoïque), le facteur C/EBP α remplace le facteur NFI-A sur sa séquence du promoteur du miR-223 et induit son expression. Le miR-223 exprimé va réprimer l'ARNm du facteur NFI-A et par conséquent diminuer le nombre des protéines NFI-A, ce qui va induire la différenciation des cellules NB4 indifférenciées en granulocytes (Fazi *et al*, 2005).

Figure 18 : Schéma représentant la régulation négative du gène codant le facteur NFI-A par les complexes PcG-miR-223 dans le cadre de l'induction de la différenciation des granulocytes. (A) Dans le cas des cellules indifférenciées, Le facteur YY1 est présent à un faible niveau avec AGO-1 aux sites sur le promoteur de NFI-A, ceci induit un enrichissement des marques chromatiniens (acH3, H3K4me3) et une diminution des marques H3K27me3 avec des îlots CpGs déméthylés. Toutes ces conditions vont permettre le recrutement de l'ARN poly II pour la transcription du gène de NFI-A. (B) durant la différenciation des granulocytes, en présence du miR-223 dans le noyau et via la formation du complexe composé de Dicer 1/AGO-1-YY1, miR-223 cible sa séquence d'ADN complémentaire située sur le promoteur du facteur NFI-A. l'augmentation du complexe PcG-miR-223 à ses sites va induire l'augmentation des marques H3K27me3 et la diminution des marques H3K4me3 et une méthylation des îlots CpGs. Par conséquent, la transcription du gène du facteur NFI-A est réprimée et les précurseurs myéloïdes se différencient en granulocytes (Zardo *et al*, 2012).



À côté de son rôle de différenciation des granulocytes, miR-223 semble être impliqué dans la détermination de l'identité d'autres types cellulaires dans le système hématopoïétique. En effet, miR-223 régule avec d'autres miRs la différenciation des précurseurs myéloïdes en monocytes. De plus, Lu *et al* ont trouvé que le miR-223 régule la prolifération des éosinophiles progénitrices en régulant le niveau d'expression du facteur IGF1R (insulin-like growth factor 1 receptor) (Lu *et al*, 2013). Durant la différenciation des ostéoclastes à partir de la lignée des précurseurs myéloïdes, le facteur PU.1 régule positivement le miR-223, ce qui induit la répression du facteur NFI-A (Sugatani *et al*, 2009).

Le miR-223 semble aussi cibler LIM-only 2 (LMO2). Ceci induit une différenciation des cellules myéloïdes en mégacaryocytes. LMO2 est considéré comme un oncogène car son expression ectopique dans les cellules hématopoïétiques induit des cellules T leucémiques (Nam & Rabbitts, 2005). Il a été décrit une voie de régulation durant l'hématopoïèse et qui est composé de miR-223, C/EBP- β , LMO2 et miR-142 (*figure 19*). Ceci va permettre de réguler la prolifération cellulaire. Dans le cas d'une expression ectopique du LMO2, il y a une répression du miR-142 et ainsi une accélération de la prolifération cellulaire pouvant induire la leucémie (Sun *et al*, 2010).

Finalement, il a été montré qu'il existait des microvésicules pouvant stimuler des cellules en transférant des molécules telles que des protéines, ARNm, des miRs et des organelles. Celles-ci sont des médiateurs importants pour la communication entre les cellules. Ces microvésicules dérivent du compartiment de l'endosome ou bien de la surface cellulaire. Leur production est dépendante de plusieurs facteurs tels que : le stress environnemental ou la concentration du calcium ainsi que les cytokines tel que l'interleukine-1 β (IL-1 β). Il a été reporté que les microvésicules circulant dans le plasma normal humain contiennent des miRs qui dérivent des plaquettes et des macrophages. Les auteurs ont montré que les facteurs granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) et le phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) induisaient la production de microvésicules à partir de monocytes et de cellules myéloïdes leucémiques (THP-1) respectivement. Ces microvésicules transférées dans des cultures cellulaires non traitées induisent la différenciation cellulaire de cellules THP-1 et de monocytes naïfs. Les cellules myéloïdes générées par des microvésicules tumorales produisent des cytokines pour promouvoir la croissance tumorale. Par contre, les macrophages normaux produisent des microvésicules pour maintenir l'homéostasie et la production de cellules immunitaires (Ismail *et al*, 2013). Valadi *et al* ont confirmé que les molécules d'ARNs contenues dans les microvésicules dérivés des macrophages sont transportées aux cellules monocytaires et d'autres lignées cellulaires. Les microvésicules dérivées de macrophage présentent une forte expression du miR-223 (*figure 20*). Ce dernier peut être transporté à d'autres lignées progénitrices pour compléter leurs maturations telles que les granulocytes et les mégacaryocytes.

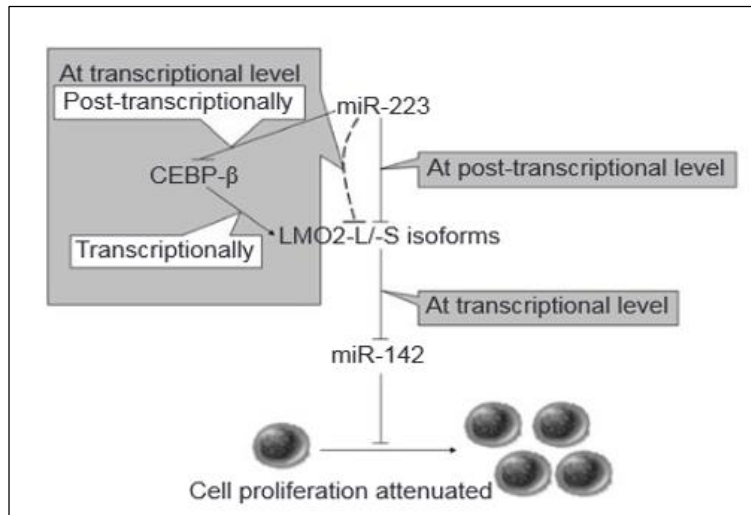


Figure 19: Diagramme représentant la régulation négative du facteur LMO2 par le miR-223. La régulation du facteur LMO2 par ce dernier se fait soit au niveau post transcriptionnelle soit au niveau transcriptionnelle en réprimant dans ce cas le facteur C/EBP β (montré dans le cadre bleu). De plus, LMO2 régule négativement le miR-142 au niveau transcriptionnel. miR-142 est un répresseur de la prolifération cellulaire et donc sa répression va accélérer la prolifération cellulaire et induire des maladies tel que la leucémie (Sun *et al*, 2010)

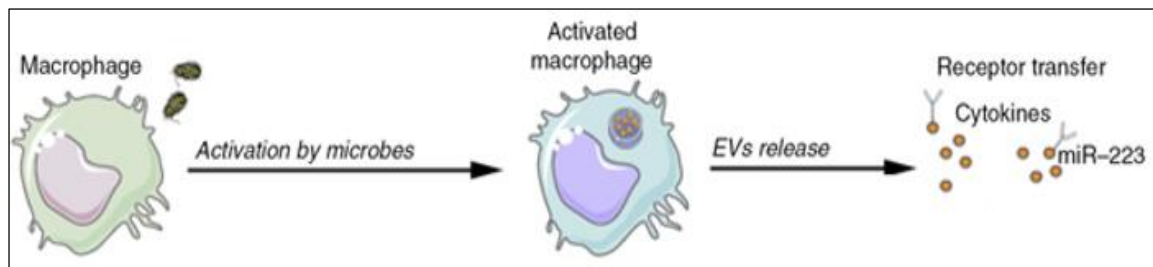
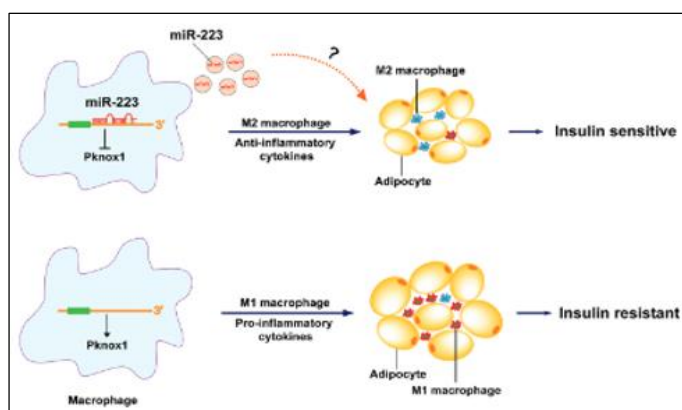


Figure 20 : Schéma représentant le rôle des EVs (vésicules extracellulaires) en relation avec les cellules du système immunitaire inné. Les macrophages activés libèrent des EVs qui contiennent cytokines et le miR-223 pour influencer la prolifération et la différenciation des cellules myéloïdes (Yáñez-Mó *et al*, 2015).

2- Rôles du miR-223 dans les réactions inflammatoires :

Zhuang *et al* ont mené une étude pour définir le rôle du miR-223 dans le tissu adipeux, en relation avec la résistance à l'insuline. Ils ont soumis des souris délétées de miR-223 (-/-) à un régime riche ou faible en graisse en comparaison avec des souris contrôles miR-223 (+/+) (WT) pendant 12 semaines. Les souris miR-223 (-/-) présentaient une résistance à l'insuline et une intolérance au glucose par rapport au WT. De plus, Les souris miR-223 (-/-) qui suivaient un régime riche en graisse avaient plus de graisses viscérales et de tissus adipeux que le groupe WT. S'ajoute à ceci, la présence dans le tissu adipeux du facteur nucléaire kappa B p65, impliqué dans les voies inflammatoires ainsi que des taux élevés de médiateurs inflammatoires tels que : l'interleukine 6 (IL-6) et tumor necrosis factor alpha (TNF- α). Ils ont également observé une infiltration importante des macrophages pro inflammatoires (M1). Les auteurs ont conclu que le miR-223 joue un rôle dans l'activation des macrophages car sa suppression induit une augmentation des macrophages de type M1 ainsi qu'une inflammation du tissu adipeux et une résistance à l'insuline. De plus, miR-223 est impliqué dans la régulation de la polarisation des macrophages en inhibant le facteur Pknox1 et en stimulant l'activation de la voie anti inflammatoire dans le tissu adipeux (*figure 21*) (Zhuang *et al*, 2012). Des études in vitro sur des macrophages ont montré que le miR-223 est impliqué en collaboration avec le miR-15a et le miR-16 dans la régulation négative de la voie non canonique du facteur NF- κ B en ciblant le facteur Inhibitor of NF- κ B kinase subunit alpha (IKK α) sur sa séquence en 3'UTR et ainsi inhiber cette voie de signalisation (Li *et al*, 2010).

Figure 21: Schéma représentant la régulation de la polarisation des macrophages et l'homéostasie métabolique par le miR-223. L'activation de la voie alternative des macrophages M2 est induite par la liaison du miR-223 sur la région 3' non traduite de sa cible Pknox1 (Meng *et al*, 2012).



Un autre rôle attribué au miR-223 est celui de régulateur postranscriptionnel de la protéine nucleotide-binding domain leucine-rich repeats protein family (NLRP3). Ce dernier induit la formation de l'inflammasome dans l'immunité innée ainsi que la production des cytokines pro inflammatoires : IL-18 et IL-1 β . Le miR-223 régule négativement NLRP3 dans les cellules neutrophiles primaires et contrôle l'activation de l'inflammasome dans les macrophages (Bauernfeind *et al*, 2012).

La dérégulation du miR-223 s'est révélé être liée à plusieurs désordres d'origine inflammatoire. En effet, miR-223 est surexprimé dans le synovium et les cellules T périphériques dans la polyarthrite rhumatoïde chez l'humain (Fulci *et al*, 2010) ainsi que dans les cellules mononucléaire périphériques dans l'arthrose (Okuhara *et al*, 2012). Aussi, le miR-223 est surexprimé dans la muqueuse colique chez les patients atteints de l'IBD (inflammatory bowel disease) (Fasseu *et al*, 2010). La surexpression du miR-223 dans IBD induit l'inhibition du régulateur négatif (nommé Roquin) de la cytokine IL-17. Cette dernière étant surexprimé, va augmenter l'inflammation.

3- miR-223 et cancer:

Comme expliqué précédemment, miR-223 est impliqué dans le système immunitaire. Donc, il ne serait pas étonnant qu'il soit impliqué lors de sa dérégulation dans les hémopathies malignes comme les lymphomes et les leucémies et même dans d'autres cancers tels que le cancer du côlon et du sein.

Dans le cas de la leucémie myéloïde aigue (LMA), l'expression de la protéine de fusion de : Acute myeloid leukemia-1 transcription factor/ Eight-twenty-one co-repressor (AML1/ETO) induit la répression de l'expression du miR-223 par un remodelage chromatinien via des modifications épigénétiques. Par conséquent, les cellules maintiennent un état indifférencié avec un potentiel prolifératif élevé. Cependant, un traitement avec des agents déméthylants peut induire la différenciation de ces cellules cancéreuses, ce qui constitue une opportunité en thérapeutique. De plus, la répression transcriptionnelle du miR-223 est induite suite à la liaison du facteur E2F1 à son promoteur et ainsi l'augmentation de la progression du cycle cellulaire.

Dans le cas du cancer du côlon et du sein, il a été montré que la mutation de type gain de fonction de la protéine p53 est associée à une résistance à la chimiothérapie. Cela est dû à la répression de l'expression du miR-223 par la liaison à son promoteur de p53 en coopération avec le répresseur transcriptionnel Zinc E-box Binding factor 1 (ZEB1) dans ces cellules cancéreuses (Masciarelli *et al*, 2013).

D'un autre côté, miR-223 peut agir comme un signal dans la communication entre les tumeurs et les cellules immunitaires dans le microenvironnement tumoral via son transport dans des microvésicules. Par exemple, ce miR est activement transféré à partir des macrophages associés aux tumeurs stimulés par l'IL-4 vers les cellules du cancer du sein, ce qui induit l'augmentation du pouvoir invasif de ces cellules cancéreuses (Laios *et al*, 2008).

Finalement, les différentes fonctions physiologiques attribuées au miR-223 lui confèrent un grand potentiel pour influencer la carcinogenèse. Son rôle dans la régulation de la différenciation est très important pour les cancers d'origine hématopoïétique où la dé-différenciation est la caractéristique commune vu qu'elle augmente le potentiel prolifératif. De plus, miR-223 peut altérer plusieurs hallmarks du cancer définit par Hanahan et Weinberg (Hanahan & Weinberg, 2011) comme la régulation du cycle cellulaire, la survie cellulaire, la métastase et l'évasion immunitaire. Sa prédominance dans les microvésicules à partir de plusieurs types cellulaires lui permet de jouer un rôle dans la communication entre les cellules cancéreuses et le microenvironnement. miR-223 semble jouer un rôle de suppresseur de tumeurs dans plusieurs cas de cancer, car il cible spécifiquement des effecteurs oncogéniques et il est réprimé dans plusieurs cancers.

4- miR-223 et infection virale:

Le virus de la grippe A de type H1N1 constitue toujours une menace pour la santé publique. Des études de génomique fonctionnelle ont révélées que l'extrême virulence du virus r1918 (virus de la grippe 1918 reconstruit par génétique réverse) est corrélée à une expression atypique du miR-223 avec d'autres miRs. En effet, miR-223 réprime indirectement l'activité du facteur de transcription C-AMP Response Element-binding protein (CREB) en régulant ses trois voies en amont qui sont : le récepteur insulín-like growth factor (IGF-1), canaux calcium (Ca^{2+}) et la voie de signalisation des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR). De plus, des molécules intermédiaires de ces voies comme le Phosphoinositide 3-kinase (PI3K), protein phosphatase 2 A (PP2A) et protein kinase A (PKA), est réprimée par le miR-223. La répression de CREB va augmenter la mort cellulaire et permettre l'infection létale du virus *in vivo* (Li *et al*, 2010). Une autre étude a montré que le miR-223 peut être un marqueur de la lésion du foie chez des patients infectés par le virus de l'hépatite B.

Le miR-223 a été retrouvé avec un taux élevé dans le sérum des patients atteints de l'hépatite B mais aussi chez ceux atteints du carcinome hépatocellulaire (Xu *et al*, 2011). Toutefois, le miR-223 peut agir comme agent antiviral par des mécanismes de défense immunitaire contre les ARNs viraux.

Une étude a montré que l'expression du miR-223 est liée à la capacité des cellules T ainsi que les monocytes et les macrophages de se défendre contre l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1). De plus, miR-223 cible l'extrémité 3' de l'ARNm du VIH-1 et se trouve fortement exprimé dans les cellules T CD4⁺ au repos c'est-à-dire les cellules où la réplication du VIH-1 est réprimée (Huang *et al*, 2007).

Finalement, Une étude de Moles et ses collaborateurs, a montré que le miR-223 est réprimé dans les leucémies T et les lymphomes induite par le rétrovirus Human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) chez l'humain. Cette infection induit la dérégulation de la prolifération des cellules T CD4/CD25. De plus, l'onco-protéine virale Tax joue un rôle dans l'immortalisation de ces cellules T infecté en ciblant entre autre les suppresseurs de tumeurs et des régulateurs du cycle cellulaire. La répression du miR223 est corrélée avec l'augmentation du facteur de transcription Signal Transducers and Activators of Transcription 1 (STAT1) dans les lignées de cellules transformées par HTLV-1 *in vivo* et *in vitro*. Ceci s'explique par le fait que STAT1 est une cible du miR-223 qui se lie au niveau de sa séquence 3' UTR dans les cellules normales ce qui n'est pas le cas dans les cellules infectées étant donné que le miR-223 est réprimé. De plus, l'augmentation de l'expression de l'ARNm viral codant le facteur viral HTLV-bZIP augmente l'activité transcriptionnel du facteur E2F1 qui a été déterminé dans d'autres études comme répresseur du promoteur du miR-223 (Moles *et al*, 2015).

Les différentes fonctions attribuées au miR-223 sont liées à la variété de ses gènes cibles (*tableau 3*). Par conséquent, la régulation de ses cibles potentielles constitue une thérapie éventuelle pour de nombreuses pathologies.

VII- Herpesvirus et régulation épigénétique des gènes cellulaires:

La famille des herpesvirus a la particularité d'établir et maintenir une infection latente durant sa pathogenèse. Ceci est dû à l'expression de nombreux gènes viraux qui vont contribuer à contrôler d'un côté les fonctions cellulaires afin de réguler la balance phase latente et lytique du virus et de l'autre côté, permettre la réplication virale en intervenant au niveau de la survie cellulaire et réguler la réponse immunitaire. De plus, cette famille de virus assure la régulation de l'expression des gènes cellulaires en induisant des modifications épigénétiques comme les virus Epstein Barr virus (EBV) et Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus virus (KSHV).

EBV se maintient dans les cellules infectées en inhibant leur entrée en apoptose. En effet, ce virus réprime le facteur pro-apoptotique Bcl2-interacting mediator (BIM) par ses protéines virales B nuclear antigen 3A et 3C (EBNA3A et EBNA3C) qui recrutent le complexe polycomb au niveau du TSS du gène BIM et vont induire les marques répressives telles que H3K27me3. De plus, ces protéines virales semblent aussi inhiber la kinase responsable de la phosphorylation de l'ARN poly II nommé cyclin-dependent kinase 7 (CDK7) par des mécanismes inconnus. Ceci va induire l'inhibition de l'initiation de la transcription du gène de BIM par l'ARN poly II (Allday, 2013).

Le virus KSHV infecte préférentiellement les cellules endothéliales et les lymphocytes B. le maintien de la latence de ce virus lors de l'infection est assuré par l'expression d'un antigène viral nommé latency-associated nuclear antigen (LANA). Ce dernier induit la modification négative ou positive de l'expression des gènes cellulaire (Paschos & Allday, 2010). Parmi les gènes réprimés

identifiés sont les gènes de Cycline 2 (CCDN2), Lactate dehydrogenase B (LDHB), cellular repressor of E1A-stimulated genes (CREG). La répression génique par LANA est principalement due à la méthylation de l'ADN en se liant avec des répresseurs transcriptionnels comme le methyl CpG binding protein 2 (MeCP2) (Krithivas *et al*, 2002).

1- Influence du GaHV-2 sur les miRs cellulaires :

Le GaHV-2 a la capacité d'encoder ses propres miRs. De plus, ce virus peut modifier le profil d'expression des miRs cellulaires lors de son infection. Trois études se sont focalisées sur la comparaison de l'expression des miRs cellulaires chez des poulets sains et infectés par le GaHV-2. Les échantillons infectés représentent les différents stades d'avancements de la lymphomagenèse induite par GaHV-2 (Yao *et al*, 2009., Tian *et al*, 2012., Stik, 2012) (Tableau 4).

Ils ont trouvé qu'il y a des miRs cellulaires surexprimés tels que le gga-miR-146, gga-miR-21, gga-miR-221. Ce qui réconforte l'hypothèse de leurs implications dans le processus de la tumorigenèse. Toutefois, d'autres miRs cellulaires sont sous régulés après l'infection virale tels que gga-miR-155, gga-miR-126 et gga-miR-223. Cela laisse supposer leurs implications comme suppresseurs de tumeurs.

	Stik <i>et al</i> , 2013	Tian <i>et al</i> , 2012	Yao <i>et al</i> , 2009
Répression des microARNs cellulaires *			
gga- miR-26a	0	0,7	1
gga- miR-155	0	ND	3
gga- miR-126	2,5	0,9	2
gga- miR-181a	2	2	ND
gga- miR-223	4	0,7	5
Surexpression des microARNs cellulaires *			
gga- miR-146a	ND	- 1,3	ND
gga- miR-146b	0	ND	3
gga- miR-146c	5	ND	ND
gga- miR-21	2	- 0,7	ND
gga-miR-221	3, 5	0,8	4

Tableau 4: représentation de quelques miRs cellulaires du poulet retrouvés surexprimés ou réprimés lors de l'infection par le GaHV-2 dans trois études différentes effectuées par trois équipes différentes (Stik *et al*, Tian *et al* et Yao *et al*). ND (non déterminé), les valeurs représentent les facteurs de surexpression ou de répression.

Objectifs du travail :

Lors d'une infection du poulet par le GaHV-2, les miRs cellulaires sont dérégulés par ce dernier afin de permettre sa maintenance dans les cellules infectées. En effet, des résultats des banques de miRs cellulaires de poulet issu de trois études ont montré que certains de ces miRs sont surexprimés tandis que d'autres sont réprimés (Yao *et al*, 2009., Tian *et al*, 2012., Stik, 2012).

Dans le cadre de ce mémoire, on s'est intéressé à caractériser les processus cellulaires ou viraux entraînant la répression du miR cellulaire gga-miR-223 lors de l'infection par GaHV-2. L'homologue de ce miR chez l'homme est impliqué dans plusieurs processus cellulaire allant de la régulation du cycle cellulaire jusqu'à la différenciation et la fonction des cellules du système immunitaire. De plus, sa répression est corrélée à l'apparition de cancers tels que les hémopathies malignes (leucémies) et les tumeurs solides (cancer du côlon). Ceci lui attribue donc un rôle potentiel de suppresseur de tumeur.

L'hypothèse émise propose que la répression du gga-miR-223 par le GaHV-2 dans les cellules infectées résulte des modifications épigénétiques car la famille des *herpesvirus* dont le GaHV-2 sont connu pour induire des remodelages chromatinien au niveau des histones ainsi que la méthylation de l'ADN. En effet, deux études ont identifié des marqueurs répresseurs et activateurs au niveau des histones des gènes cellulaires du poulet réprimés ou surexprimés respectivement lors de l'infection par ce virus (Mitra *et al*, 2012 ; Mitra *et al*, 2015). D'après ceci, il serait intéressant d'investiguer l'intervention d'un facteur viral dans ce processus.

L'objectif de ce mémoire est de caractériser les isoformes transcriptionnelles du gga-pri-miR-223 chez le poulet car jusqu'à présent, il n'existe pas dans les banques de données l'organisation génomique du miR-223 chez cette espèce. Pour répondre à cet objectif, la première étape est la prédiction des isoformes transcriptionnelles potentielles du gga-pri-miR-223 par une analyse bio-informatique.

La deuxième étape est d'utiliser la qRT-PCR pour choisir le système biologique où l'expression du gga-pri-miR-223 est suffisante pour les analyses ultérieures étant donné que ce transcrit primaire est peu abondant dans les cellules et est rapidement soumis au clivage par le complexe Drosha.

La troisième étape est l'amplification des isoformes transcriptionnelles possibles du gga-pri-miR-223 par la PCR nichée dans le système biologique adapté.

Matériel et méthodes :

I. Culture cellulaire

1.1- Les cellules CEF (*chicken embryo fibroblasts*) :

Les cellules CEF primaires ont été obtenues par trypsinisation d'embryon de poulets de 12 jours. Ces cellules sont cultivées dans un milieu de culture nommé DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Lonza). Il s'agit d'un milieu additionné de L-Glutamine et 4,5 g de glucose. De plus, il contient plusieurs composants comme des vitamines, des acides aminés et des sels inorganiques. Ce milieu est supplémenté avec : 10% du FBS (fœtal bovine serum), 2,5% CS (chicken serum), 1% tryptose phosphate (1,475 g/l) (vitamine), 1% de fungizone (amphotéricine, 250 mg/ml), ainsi que des antibiotiques qui sont : la pénicilline (50 unités/ml) à 1,25% et la streptomycine (50 µg/ml) à 1%. Après 4 jours d'incubation, les CEF secondaires sont obtenus par passage des cellules CEF primaires. Ces CEF secondaires sont cultivées dans du DMEM supplémenté avec : 1% de FBS, 0,5 % CS, 1% pénicilline/ streptomycine, 1% fungizone (amphotéricine B), 1% tryptose phosphate (1.475 g/l) (Sigma life science). 1.5×10^6 de cellules ont été maintenues dans des flasques de 75 cm² et ont été incubées à 40°C avec 5% CO₂.

1.2- Les cellules MSB-1 :

La lignée cellulaire MSB-1 est une lignée lymphocytaire CD4+ infectée de manière latente par deux espèces virales qui sont le GaHV-2 et GaHV-3. Cette lignée a été obtenue à partir d'un lymphome de rate de poulet. Les cellules MSB-1 ont été maintenues en suspension dans du milieu RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute-1640) (Gibco). Ce milieu est supplémenté avec : 10% FBS, 5% CS, 1% pyruvate de sodium (100 mM), 1% d'acides aminés non essentiels (750 mg/l glycine, 890 mg/l L-Alanine, 1320 mg/l L-Asparagine, 1330 mg/l acide L-Aspartique, 1470 mg/l acide L-Glutamique, 1150 mg/l L-proline et 1050 mg/l L-serine), 50 µg de streptomycine/ml et 50 unités de pénicilline/ml. Finalement, les cellules ont été incubées à 40°C avec 5% de CO₂.

II. Extraction de la rate d'embryons de poulets :

Des œufs de ferme ont été incubés à 37°C pour 12, 15 et 18 j (jours). À chaque temps d'incubation, la rate est prélevée puis broyée et conservée à -80°C dans du PBS jusqu'à l'analyse.

III. Extraction des vaisseaux sanguins embryonnaires

Les VS (vaisseaux sanguins embryonnaires) ont été prélevés d'œufs de poulets. Ceux-ci sont récupérés après : 42h (heures), 54h, 66h et 78h (*figure 22*). Le réseau sanguin qui entoure l'embryon est coupé puis déposé dans du PBS (phosphate-buffered saline) avec EDTA (Éthylène Diamine Tétra-Acétique) afin de faciliter la séparation du jaune d'œuf et de la membrane vitelline où se trouvent les vaisseaux sanguins embryonnaires. Les vaisseaux sanguins sont mis dans un tube avec 100 µl de trypsine puis incubés pendant 10 à 15 min (minutes) à 37°C afin d'activer l'enzyme (trypsine) et de digérer les protéines et séparer les cellules. Ensuite, une centrifugation est réalisée à 500 g pendant 5 min puis la trypsine est enlevée. Finalement, les cellules sont resuspendues dans 100 µl de PBS et conservées à -80°C.

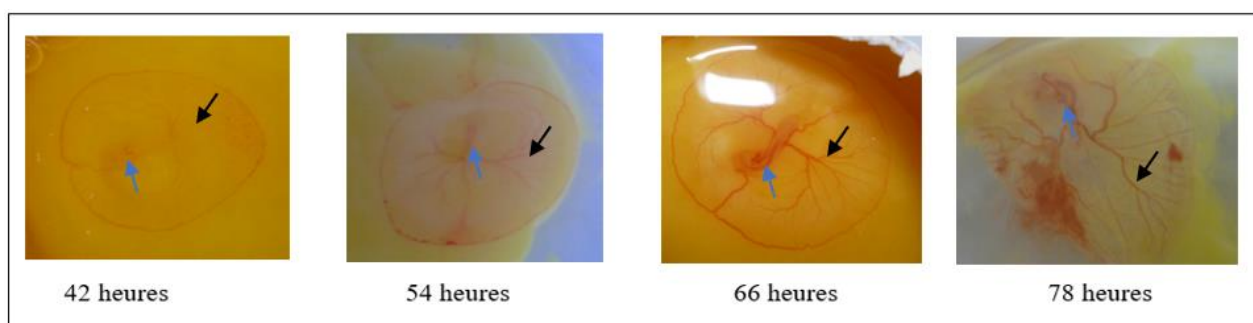


Figure 22: Photos des vaisseaux sanguins embryonnaires du poulet à différents temps d'incubation (42h, 54h, 66h et 78h). La flèche noire indique les vaisseaux sanguins et la flèche bleue indique l'embryon.

IV. Extraction d'ADN et quantification

L'ADN génomique est purifié à partir de cellules de vaisseaux sanguins d'embryon de poulet âgé de 3 jours (maximum 5×10^6 cellules) en utilisant le kit « DNeasy blood and tissue » de QIAGEN. Les cellules ont été centrifugées 5 min (minutes) à 300 g et le culot est ensuite suspendu dans 200 µl de PBS. Après, 20 µl de protéinase K plus 200 µl de tampon de lyse sont rajoutés pour digérer les composants des cellules et libérer l'ADN. Le mix est incubé 10 min à 56°C. Ensuite, 200 µl d'éthanol est ajoutée à l'échantillon pour permettre la fixation de l'ADN à la colonne de silice et centrifugé. Deux lavages sont réalisés avec 500 µl de tampon de lavage. Finalement, l'échantillon est élué dans un eppendorf en ajoutant 50 µl de tampon d'éluion et la concentration de l'ADN dans l'échantillon est déterminée par le NanoDrop 1000 spectrophotometer v3.7 (Thermo Scientific).

V. Séparation nucléaire et cytoplasmique

Cette technique a été mise au point dans le but d'enrichir la fraction nucléaire des échantillons et ainsi le gga-pri-miR-223.

Les cellules en suspension des vaisseaux sanguins embryonnaires de poulet sont lavées deux fois par le PBS froid. Ensuite, il est enlevé après une centrifugation de 5 min à 400g. Un HB (tampon hypotonique) 2X (dilué deux fois) composé de (20 mM Hepes, 5 mM NaF, 1 mM Na₂MoO₄, 0,1 mM EDTA) est ajouté aux cellules pendant 1 min afin de permettre le gonflement des cellules et la fragilisation de leurs membranes cytoplasmiques. Le HB est remplacé par le tampon de lyse composé du HB 2X avec 0,2% NP40 afin de lyser la membrane cytoplasmique sans affecter le noyau. Après une incubation de 5 min, les cellules sont centrifugées pendant 3 min à 400 g. Le

suragent contenant les ARNs cytoplasmiques est séparé du culot qui contient les noyaux cellulaires. L'ajout de la RNase in (inhibiteur de la RNAase) (20 unités/μl, promega) dans le suragent est nécessaire pour la protection des ARNs cytoplasmiques de la dégradation par les enzymes. Le culot est resuspendu dans 100 μl de PBS. Les deux fractions sont conservées à -80°C.

VI. Extraction d'ARN et quantification

Les cellules de vaisseaux sanguins embryonnaires de poulets (maximum 5-10*10⁶) étaient en suspension dans 100 μl de PBS. 1 ml de TRI-Reagent (Ambion) est ajouté à celle-ci. Le trizol est une solution chimique qui contient du phénol et du guanidinium thiocyanate qui est un agent chaotrope qui dénature les protéines telle que les RNase et les protéines qui se lient à l'acide nucléique. L'étape suivante consiste à incuber le mix pendant 5 min et centrifuger à 12.000 g pendant 10 min à 4°C afin de garder la stabilité de l'ARN. Le suragent est récupéré et 200 μl de chloroforme sont rajoutés. Le chloroforme en association avec le solvant phénol qui se trouve dans le TRI-reagent vont permettre la séparation en différentes phases. Les protéines dissoutes dans le phénol et les lipides dissoutes dans du chloroforme vont se retrouver dans la phase organique. La phase en interface contient de l'ADN tandis que l'ARN reste dans la phase aqueuse. Une centrifugation à 12.000 g est réalisée pendant 15 min à 4°C. La phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube avec 500 μl d'isopropanol afin de précipiter l'ARN. Après la centrifugation, le culot est lavé avec de l'éthanol 70%. Finalement, l'ARN est resuspendu dans 30 μl d'eau sans RNase et DNase. La concentration de l'ARN est déterminée par le NanoDrop 1000 spectrophotometer v3.7 (Thermo Scientific) et la pureté de l'ARN est déterminée par le ratio 260 nm et 280 nm.

Le kit miRNeasy (Qiagen) a été utilisé par la suite pour l'extraction de l'ARN nucléaire et cellulaire des VS embryonnaires en suivant la procédure établie par le fournisseur. Ce kit a été choisi pour sa capacité d'enrichir l'échantillon en miR et d'ARN total à partir de tissus ou de cellules en faible nombre. Le traitement à la DNase est inclus dans le kit.

VII. Traitement de l'ARN à la DNase I

Le but de cette méthode est d'éliminer toutes traces de l'ADN génomique résiduel dans les échantillons d'ARNs après l'extraction de l'ARN totale par la méthode du TRI-Reagent. La première étape consiste à resuspendre 10 μg d'ARN dans le tampon de réaction DNaseI (BioLabs) à un volume final de 100 μl. 2 unités de l'enzyme DNaseI (200 U/ml, BioLabs) sont ajoutées au mix ; la DNaseI est une endonucléase qui clive l'ADN de façon non spécifique et génère des tri/di-oligonucléotides avec une extrémité 5' phosphate et 3'OH. Le mix est ensuite incubé à 37°C pendant 10 min afin d'activer l'enzyme. 5 mM d'EDTA sont rajoutés au mix afin de protéger l'ARN de se dégrader lors de l'activation de l'enzyme. L'enzyme est inactivé par chauffage du mix à 75°C pendant 10 min.

VIII. La transcription inverse

1.1- RT *gène non spécifique*

Le super script Qscript cDNA (Quantana) a été utilisé afin de générer de l'ADNc pour la PCR nichée. Ce mix contient le tampon de réaction, du MgCl₂, des dNTPs (désoxyribonucléotides tri phosphate) à 10 mM, un inhibiteur de l'RNase (ribonucléase), Qscript RT (enzyme de la transcriptase inverse), des hexamères d'amorces aléatoires, des amorces oligo dt et des stabilisateurs. La matrice d'ARN (1 μg-10 pg) est ajoutée à 10 μl d'eau RNase/DNase free. Ensuite, le mix est placé dans le thermocycleur qui réalise les cycles comme suit : 5 min à 25°C suivi de 30 min à 42°C et 5 min à 85°C.

Le kit Iscript cDNA synthesis (Bio Rad) a été utilisé afin de générer de l'ADNc pour la qRT-PCR. La réaction RT est réalisée dans un volume final de 20 µl. le mélange contient : le tampon super mix 5X, 1µl de l'enzyme reverse transcriptase, 500 ng à 1 µg de l'ARN matrice. Le mix est ensuite placé dans le thermocycleur et est réalisé comme suit : 5 min à 25°C suivi de 30 min à 42°C et 5 min à 85°C.

1.2- RT spécifique de gène

Un pré-mix de 13µl a été préparé en ajoutant 0,5 µl d'amorces spécifiques (2 pmol, Eurogentec) (*tableau 5.I*), 500 ng d'ARN cellulaire, 1 µl de dNTP (10 mM) et 0,5 µl d'eau RNase/Dnase free. Le pré-mix est chauffé à 65°C pendant 5 min et incubé dans la glace pendant 1min afin de préserver la structure de l'ARN. À ce pré-mix s'ajoute : 4 µl de tampon first-strand (Invitrogen), 1µl de DTT 0,1M (dithiothreitol, Invitrogen) afin de réduire les ponts disulfures des protéines, 1µl de RNase out (20 unités/µl, Promega) qui est un inhibiteur de la ribonucléase, 1µl de Superscript III (200 unités/µl, Invitrogen) qui est l'enzyme transcriptase inverse. Le mix final est incubé pendant 60 min à 55°C pour permettre la réaction de l'enzyme, ensuite l'enzyme est inactivé en chauffant à 70°C pendant 15 min. finalement, 0,8 µl de RNase H (2 unités, NEB) est ajoutée et le mix final est incubé à 37°C pendant 20min, le but est d'éliminer l'ARN hybridé à l'ADNc.

La transcription inverse du gga-miR-223 pour la qRT-PCR a été réalisé en utilisant le Superscript III (200 unités/µl, Invitrogen) et à l'aide d'une amorces spécifique (GSP) (*tableau 5.II*). Chaque réaction RT est réalisée dans un volume final de 20µl contenant le tampon 5X (Invitrogen), 1µl de DTT (0,1M), dNTP (10 mM), 500 à 1 µg d'ARN, l'amorce reverse GSP (2µm), 0,5 µl de RNase in (20 unités/µl) et 0,5µl de l'enzyme de la Superscript III. Le mélange est ensuite incubé pendant 60 min à 55°C puis 15 min à 70°C pour inactiver l'enzyme.

Nom des amorces	Séquence 5'→ 3'	Position sur le chromosome (4) du poulet (pb)
I. RT pour la PCR		
reverse gga-miR-223 version1 (exon4)	CACCTTCTCTTGCTGCCCTGG	255.536 – 255.556
reverse gga-miR-223 version3 (exon3)	CCAAAGCCAAACAACAGAGC	243.021 - 243.040
reverse gga-miR-223 version 2 (exon4)	ATTATTAGCTCCCGACTTCAA	244.647 - 244.667
reverse gga-miR-223 version1 (exon4)	GCAGAATATGGATGTGAAGGAG	242.795 - 242.816
reverse gga-miR-223 (exon5)	GCAGAATATGGATGTGAAGGAG	242.796 – 242.817
reverse gga-miR-223 (exon6)	GACTTCAAGTTCCTCACTGAC	244.637 - 244.655
II. RT pour la qRT-PCR		
GSP de gga-miR-223	CATGATCAGCTGGGCCAAGATGGGGTATTTG	

Tableau 5: Oligonucléotides utilisées pour la transcription inverse gène spécifique. (I.) représente les amorces utilisées pour la PCR. (II.) représente l'amorce reverse utilisée pour amplifier le gga-miR-223 (22nt) en qRT-PCR.

III. La réaction PCR (polymerase chain reaction)

La PCR est une méthode utilisée pour amplifier une région d'un gène d'intérêt en ciblant l'ADN ou l'ADNc obtenue après la réaction de la transcriptase inverse. Différents amorces ont été utilisées afin de cibler plusieurs transcrits potentiels du gga-pri-miR-223 (*tableau 6.I.II*). La réaction a été réalisée dans un volume final de 25 µl, ce mix contient 0,07 µl de l'ADN polymérase GoTaq (Promega), 2 µm de chaque amorces (forward et reverse), 10 mM de chaque dNTP, tampon Green GoTaq 5X (Promega) qui contient du MgCl₂, 2µl de l'ADNc. La PCR a été réalisé comme suit : 3 min à 94°C pour activer l'enzyme suivi de 35 cycles de : 30 sec (secondes) à 94°C (phase de dénaturation), 30 sec à 55°C (phase d'hybridation) et 1 à 4 min à 72°C (phase d'élongation) et finalement 7 min à 72°C (extension finale).

Des PCR nichées ont été réalisées en utilisant des amorces adaptées pour augmenter la sensibilité et diminuer la non spécificité de la réaction (*tableau 6.III, tableau 7*). La technique consiste à réaliser deux PCR successive, la première PCR est réalisée avec deux amorces : forward et reverse dites externes, et la deuxième réaction PCR est réalisé en utilisant des amorces qui se chevauchent avec les amorces de la première PCR et qui sont plus interne (nichées). Dans la première amplification, un mix de 25µl a été préparé en rajoutant 0.63µl unités de l'ADN polymérase OneTaq (Promega), 2µM de chaque amorce (forward et reverse), 10mM de dNTP, le tampon de réaction standard de OneTaq 5X (Promega), 2 µl de l'ADNc. La réaction a été réalisée comme suit : 3 min à 94°C pour activer l'enzyme suivi par 35/25 cycles de : 30 sec à 94°C (phase de dénaturation) ensuite 30 sec à 55°C (phase d'hybridation) et 1 min à 72°C (phase d'élongation). La deuxième amplification a été réalisée en ajoutant 5 µl du produit de la première PCR avec 45 µl du mix, ensuite la PCR est réalisé avec 35 cycles.

Nom des amorces	Séquence 5' -> 3'	Position sur le chromosome (4) du poulet (pb)
I. PCR 1		
gga-miR-223version1-2 forward 1	ATGGCTGTCGCCTTCAACTTAG	239.621 - 239.642
gga-miR-223version3 forward 1	GTGTAATGGTTGTCCTGTCGCT	237.614 - 237.635
gga-miR-223version1 reverse 1	CTGCCCTGGGAAGTACATCTGC	255.523 - 255.544
gga-miR-223version2 reverse 1	CTCCCAGCACCAATCTTCTCT	244.542 - 244.598
gga-miR-223version3 reverse 1	GTAATGGACTCCAGGGTCTTTC	242.988 - 243.009
II. PCR 2		
Forward gga-miR-223version3 (exon1)	CAAGTGTTCCTCCCTGGCTCC	237.916 - 237.935
Reverse gga-miR-223version3 (exon1)	CTGCGATGATTGCTGAGGTG	238.156 - 238.175
III. PCR nichée		
Forward nichée gga-miR-223version1-2	GCATGTCCTGAAATGGCTGT	239.609 - 239.628
Reverse nichée gga-miR-223version1	CACCTTCTCTTGCTGCCCTG	255.537 - 255.556
Reverse nichée gga-miR-223version2	AAACTTTGATTCTCCAGC	244.591 - 244.610
Forward nichée gga-miR-223version3	GGACGCATGGAAAGGTGTAAT	237.600 - 237.620
Reverse nichée gga-miR-223version3	GCTGCAAGGAGAAGTAATGG	243.003 - 243.022

Tableau 6: Oligonucléotides forward et reverse utilisées pour la PCR et la PCR nichée pour la première analyse bio-informatique.

Nom des amorces	Séquence 5' -> 3'	Position sur le chromosome (4) du poulet (pb)
I. PCR nichée 1		
Forward nichée gga-miR-223 (exon1)	CCATTTGCAGCTTCCTCTTG	237.400 - 237.419
Forward gga-miR-223 (exon1)	CAGCCTTATCTTCCCCATTTGC	237.386 - 237.407
Reverse nichée gga-miR-223 (exon2)	GAGGTGTGGAAAACCTTCATCTG	238.135 - 238.157
Reverse gga-miR-223(exon2)	CTGCGATGATTGCTGAGGTG	238.152 - 238.165
II. PCR nichée 2		
Forward nichée gga-miR-223 (exon1)	CCATTTGCAGCTTCCTCTTG	237.400 - 237.419
Forward gga-miR-223 (exon1)	CAGCCTTATCTTCCCCATTTGC	237.386 - 237.407
Reverse gga-miR-223 (exon3)	TTTTACATGGCTACCAGACAGG	239.763 - 239.784
Reverse nichée gga-miR-223 (exon3)	ATGGCTACCAGACAGGTCTGC	239.758 - 239.778
III. PCR nichée 3		
Forward nichée gga-miR-223 (exon1)	CCATTTGCAGCTTCCTCTTG	237.400 - 237.419
Forward gga-miR-223 (exon1)	CAGCCTTATCTTCCCCATTTGC	237.386 - 237.407
Reverse nichée gga-miR-223 (aval premir)	GAGTCCATCCCCTTGGTGTG	242.779 - 242.798
Reverse gga-miR-223	AATATGGATGTGAAGGAGTC	242.794 - 242.813
IV. PCR nichée 4		

Reverse nichée gga-miR-223 (aval premir)	GAGTCCATCCCCTTGGTGTG	242.779 – 242.798
Reverse gga-miR-223 (aval premir)	AATATGGATGTGAAGGAGTC	242.794 – 242.813
Forward nichée gga-miR-223(exon 5)	GACAGTGACAGCCTGGTGACAG	242.648 – 242.669
Forward gga-miR-223 (exon 5)	GGACATCATGCAAGCGAGGAC	242.630 – 242.650
V. PCR nichée 5		
Forward gga-miR-223 (exon 3)	TGCAGACCTGTCTGGTAGCC	239.757 – 239.776
Forward nichée gga-miR-223(exon 3)	TCTGGTAGCCATGTAAAATCCC	
Reverse nichée gga-miR-223 (aval premir)	GAGTCCATCCCCTTGGTGTG	242.779 – 242.798
Reverse gga-miR-223 (aval premir)	AATATGGATGTGAAGGAGTC	242.794 – 242.813

Tableau 7 : Oligonucléotides utilisées pour la PCR nichée pour la deuxième analyse bio-informatique.

IV. qRT-PCR (PCR quantitative en temps réelle) du miR-223 du poulet

La PCR quantitative en temps réel combine l'amplification d'ADN ou d'ADNc avec la détection et la quantification d'un signal fluorescent qui est émis par un agent intercalant de l'ADN double brins nommé le SYBRGreen. En effet, cette molécule émet un signal fluorescent lorsqu'elle est liée à l'ADN double brin et aucune fluorescence sous sa forme libre en solution. C'est un outil spécifique et sensible pour comparer le taux d'expression de l'ADNc issu d'un ARN d'un gène spécifique par RT. La réaction de l'amplification de la séquence d'intérêt suit les mêmes étapes de la PCR. L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR.

Cette technique a été utilisée dans cette étude pour quantifier l'expression du gga-miR-223 mature et le gga-pri-miR-223 dans des vaisseaux sanguins embryonnés issu de différents temps d'incubation. La réaction a été réalisée dans un volume final de 10 µl contenant 5 µl du mix « Fast Start Universal SybrGreen Master » (Roche), 0.8 µl d'amorces forward et reverse (10 µM). Ensuite, le mix est mélangé avec 2 µl d'ADNc (500 ng ou 1µg) dilué 10X. La qRT-PCR est réalisée dans des plaques de 48 puits et dans une machine qPCR (illumina Eco real-time PCR system). La réaction est réalisée comme suit : 3 min à 95°C suivi de 40 cycles: 30 sec à 95°C, 30 sec à 50°C et 30 sec à 72°C. Finalement, 30 sec à 95°C puis 15 sec à 55°C et 15 sec à 95°C. Chaque échantillon est réalisé en triplicatas techniques. Afin de vérifier qu'un seul produit PCR a été amplifié pour chaque échantillon, la courbe de fusion est utilisée. Cette courbe permet de définir la température à laquelle la moitié de l'ADN est sous forme de double brin et l'autre moitié sous forme de simple brin. Les amorces utilisées pour la qRT-PCR sont repris dans le *tableau 8*. La normalisation des données obtenus par qRT-PCR est réalisée en utilisant plusieurs gènes de références stables appelés HKG qui sont impliquées dans des processus cellulaires indépendantes. De plus, leurs expression est constitutive sans être influencée par le traitement expérimental. Trois HKG ont été utilisés pour une normalisation précise des données. Ces HKG stables ont été sélectionnés à partir d'un groupe de candidats qui sont (GAPDH, U6, 18S, B-actin, HMBS, SDHA) par à une expérience pilote sur une sélection d'échantillons représentatifs pour les conditions expérimentales sous investigation. Ensuite, un algorithme nommé GENORM a été utilisé pour classer les gènes candidats selon leur stabilité. Ce logiciel calcule automatiquement la valeur M, qui est la variation moyenne par paires entre un gène de référence candidat et tous les autres candidats testés. Une valeur plus élevée de M signifie une plus grande variation de l'expression du gène. L'élimination progressive de gènes avec les valeurs les plus élevées de M permet ainsi le classement des gènes testés en fonction de leur stabilité de l'expression.

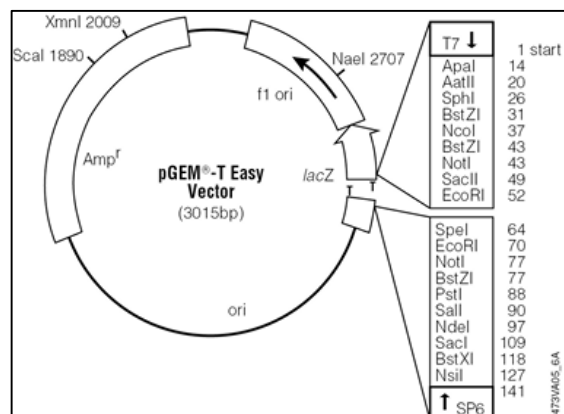
Nom des amorces	Séquence 5'-> 3'	Position sur le chromosome (4) du poulet (pb)
VI. qRT-PCR		
<i>Amorces pour gga-miR-223</i>		
LNA (locked nucleic acid) forward du miR-223	TGT(C)AGTTT(G)TCAA	
U.P (universel primer) reverse du miR-223	CATGATCAGCTGGGCCAAGA	
<i>Amorces pour gga-pri-miR-223 (151 pb)</i>		
Forward nichée gga-miR-223(exon 5)	GACAGTGACAGCCTGGTGACAG	242.648 – 242.669
Reverse nichée gga-miR-223 (aval premir)	GAGTCCATCCCCTTGGTGTG	242.779 – 242.798
<i>Amorces pour les HKG</i>		
<i>GAPDH forward</i>	GTCCTCTCTGGCAAAGTCCAAG	
<i>GAPDH reverse</i>	CCACAACATACTCAGCACCTGC	
<i>SDHA forward</i>	TTCCCGTTTTGCCTACGGTG	
<i>SDHA reverse</i>	CTGCCTCGCCACAAGCATAT	
<i>18 S forward</i>	GGCGGCTTTGGTGACTCTAG	
<i>18 S reverse</i>	ATCGAACCCTGATTCCCCGT	
<i>U6 forward</i>	CTCGCTTCGGCAGCACATATAC	
<i>U6 reverse</i>	TTTGCCTGTCATCCTTGCGC	
<i>HMBS forward</i>	GGCTGGGAGAATCGCATAGG	
<i>HMBS reverse</i>	TCCTGCAGGGCAGATACCAT	
<i>B-ACTIN forward</i>	GACTCTGGTGATGGTGTTAC	
<i>B-ACTIN reverse</i>	AGCACAGCTTCTCCTTGATG	

Tableau 8 : Oligonucléotides (forward et reverse) utilisées pour amplifier le gga-miR-223, le gga-pri-miR-223 et les HKG par qRT-PCR.

Clonage de l'insert dans le vecteur

Le vecteur pGEMTeasy est utilisé pour cloner un amplicon d'intérêt (*figure 23*). L'inactivation insertionnelle du **peptide** permet la discrimination des clones recombinants par le criblage sur un milieu de culture solide. Deux réactions de ligation sont réalisées dans cette étude en utilisant deux enzymes différentes. La première réaction est réalisée selon un ratio molaire vecteur/insert de 1/3. Le mix contient 5 µl de tampon de ligation 2X (Promega), 1 µl du vecteur pGEMTeasy (50 ng/µl, Promega), 3 µl de l'insert et 1µl de l'ADN ligase T4 (Promega). La deuxième réaction de ligation a été réalisée selon un ratio molaire vecteur/ insert de 1/7. Le mix de réaction contient dans ce cas 1µl du tampon de ligation T4 10X (NEB), 1 µl du vecteur pGEMTeasy (50 ng/µl, Promega), 7µl de l'insert et 1 µl de l'enzyme ADN ligase T4 (400 unités/ml, NEB). Dans les deux réactions, le mix est incubé à 12°C toute la nuit.

Figure 23: Le vecteur pGEMTeasy est utilisé pour cloner des produits PCR. Il est fourni sous une forme ouverte car il est coupé avec l'enzyme de restriction EcoRV, ensuite une thymidine et ajoutée aux deux extrémités 3'. Le plasmide contient plusieurs sites de restrictions dans son site MCS (site de clonage multiple), ce qui facilite la récupération de l'insert par digestion enzymatique. Ce vecteur contient aussi des promoteurs de l'ARN polymérase T7 et SP6 sur les deux bords du MCS. Le MCS est localisé à l'intérieur de la séquence codante de l'enzyme β -galactosidase. Il contient aussi l'origine de réplcation des procaryotes.



V. Transformation bactérienne

Les bactéries E.coli (Escherichia Coli) TG1 ont été utilisées pour la transformation. 1 µl du produit de ligation est ajoutée à 50 µl de bactéries compétentes et placé entre les deux électrodes de la cuvette. L'électroporation est réalisée à 2500 voltes/ 25 µF afin d'introduire le vecteur dans les bactéries électro compétentes. 150 µl de LB sont immédiatement rajouté aux bactéries. Les bactéries transformées sont étalées sur du milieu LB/agar qui contient : 1- l'antibiotique ampicilline (200 µg/ml) pour sélectionner les bactéries contenant le vecteur. 2- X-gal (600 mg/ml) et de l'IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside, 160 mg/ml) pour faciliter le criblage bleu/blanc. Les boîtes de pétri sont incubées toute la nuit à 37°C.

VI. Criblage des bactéries avec un vecteur recombinant

Le test bleu/blanc est utilisé pour sélectionner les bactéries qui ont incorporé le plasmide recombinant. Pour cela on rajoute X-gal et l'IPTG à la culture. L'IPTG est un inducteur de l'opéron lactose tandis que le X-gal est un galactoside lié à un noyau indole substitué. Les colonies transformées avec un plasmide sans insert sont bleues car le gène lac Z du plasmide est exprimé puisque le plasmide se recircularise et forme une β-galactosidase fonctionnelle. Cette enzyme hydrolyse le X-gal et libère la partie indolique qui forme ensuite par oxydation un composé bleu qui précipite au site de la réaction.

Dans le cas où les colonies transformées avec un plasmide qui contient l'insert, le gène Lac Z est inactivé par l'insertion de la séquence d'intérêt dans le plasmide. Le X-gal n'est pas hydrolysé car absence de l'enzyme β-galactosidase. Les colonies sont donc blanches.

Le criblage est réalisé par la PCR afin d'amplifier l'insert cloné dans le vecteur en utilisant des amorces s'hybridant dans le plasmide en amont et en aval de l'insert (*tableau 9*) nommé PU et RPU (reverse PU). Ces amorces encadrent le site de clonage. Chaque colonie bactérienne blanche est ajoutée au mix PCR (20µl). Ce mix est composé de 4 µl du tampon de réaction Green GoTaq 5X (Promega), 0.44 µl de dNTP (10mM), 1µl de chaque amorce: PU et RPU (2 µM) et 0.1 µl de l'ADN polymérase (Promega). La PCR est réalisée comme suit : 3 min à 94°C pour activer l'enzyme suivi par 35 cycles: 30 sec à 94°C (phase de dénaturation), 30 sec à 55°C (phase d'hybridation) et 1 min à 72°C (phase d'élongation). Le profil de l'amplification est observé par la migration sur un gel d'agarose 2% à 100 volts pendant 30-45 min.

Nom des amorces	Séquence 5'→ 3'
Amorce PU	TGTAAAACGACGGCCAGTG
Amorce RPU	CAGGAAACAGCTATGACCA

Tableau 9: Oligonucléotides utilisées pour le criblage des bactéries.

VII. Mini préparation de l'ADN plasmidique :

Les clones d'intérêt sont mis en culture sous agitation avec 100 ml du milieu LB et 100µl d'ampicilline à 37°C toute la nuit. L'extraction de l'ADN est réalisée à l'aide du kit NucleoBond pc100 DNA/RNA and protein purification (Machery Nagel). Cette méthode est basée sur une lyse alcaline suivie d'une purification sur colonne de silice selon les recommandations du fournisseur. La quantification de l'ADN plasmidique extrait est estimée par le Nano Drop 1000 spectrophotometer v3.7 (Thermo Scientific) sachant qu'une DO correspond à 50 µg/mL d'ADN. Les plasmides d'intérêt purifiés sont envoyés à la firme GATC pour le séquençage.

Résultats :

1- L'analyse bio-informatique des isoformes transcriptionnelles primaires potentiels du gga-miR-223:

GaHV-2 est un herpesvirus oncogénique responsable de l'apparition de lymphome T chez le poulet (*gallus gallus*). Durant son cycle viral, il modifie l'expression de plusieurs miRs cellulaires dont celui de gga-miR-223 qui a été retrouvé réprimée (Stik, 2012). Ce miR est aussi réprimé dans plusieurs cancers humains, indiquant son rôle potentiel de suppresseur de tumeur.

La première analyse effectuée lors de cette étude est la comparaison de la séquence du pré-miR-223 entre le poulet (*gallus gallus*) et différentes espèces de mammifères qui sont : l'humain (*homo sapiens*), la souris (*mus musculus*) et le taureau (*bos taurus*). Le but étant de visualiser l'identité entre les différentes séquences et ainsi la conservation du pré-miR-223 (*figure 24, tableau 10*). Les données sont collectées à partir de la banque de donnée miR base (<http://www.mirbase.org/>) ensuite les séquences sont alignées par le logiciel Geneious. D'après les résultats illustrés dans la *figure 24* et le *tableau 10*, les séquences du miR mature (miR 3p/miR 5p) de 22 nt sont identiques à 100 % chez les quatre espèces ce qui indique une conservation de la seed ainsi que des fonctions du miR-223. La boucle est moins conservée avec une identité de 33.3%. Toutefois, les séquences flanquantes du miR-223 3p et 5p sont conservées, indiquant le maintien du site de clivage par le complexe Drosha et Dicer. De plus, la séquence du gga-pré-miR-223 (100 pb) présente une identité de 80.2% avec les autres espèces mammifères. La similitude de la structure du pré-miR-223 entre ces espèces pourrait supposer que l'organisation génomique du miR-223 soit aussi conservée.

L'étape suivante consiste à déterminer l'organisation du gène du miR-223 chez le poulet car jusqu'à présent, aucune étude ne s'est portée sur cette caractérisation dans cette espèce. La seule donnée qui existe dans les banques des données est que le gga-pré-miR-223 est localisé sur le chromosome 4 en position 242.669- 242.768 pb (*figure 25.C*). Il serait donc intéressant de déterminer si le gga-pré-miR-223 est intronique ou exonique et s'il possède son propre promoteur ou s'il est sous le contrôle d'un promoteur d'un gène hôte. La conservation de la séquence du pré-miR-223 entre le poulet et les différentes espèces mammifères dont son orthologue humain, nous a permis de visualiser l'organisation génique du hsa-miR-223 (*figure 25.B*), car il est bien caractérisé dans la littérature (Fukao *et al*, 2007) ainsi que dans la banque de donnée GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>). En effet, il a été décrit un promoteur et deux TSS ont été identifiés par RACE au sein du gène hsa-miR-223 (Fukao *et al*, 2011). De plus, ce gène est composé de trois exons et deux introns où le hsa-pré-miR-223 est localisé sur le troisième exon (Fukao *et al*, 2007 ; Vian *et al*, 2014). Il faut noter que cette organisation est aussi observée chez la souris et même chez le zebrafish (*danio rerio*) (*figure 25.A*) (Roberto *et al*, 2015).

La suite de notre analyse était d'annoter le gène gga-miR-223 *in silico* en utilisant la base de données GenBank. Cette dernière dispose de la séquence génomique du gga-miR-223 ainsi que de courtes séquences d'introns obtenus par des analyses transcriptionnelles grâce à la technique RNA-seq (séquençage de nouvelle génération à haut débit de l'ARN). La RNA-seq est une méthode utilisée pour reconstruire des transcrits (ARNm) en générant de courts fragments de cADN (ADN complémentaire) issu de différents types cellulaires qui sont séquencées puis assemblées et alignées à la séquence génomique de référence (Trapnell *et al*, 2010). Cette approche permet la prédiction des transcrits alternatifs de gènes, ce qui est intéressant dans notre recherche. A partir de ces courtes séquences d'introns, trois isoformes transcriptionnelles potentielles du gga-pri-miR-223 ont été

obtenus en les alignant ligne par ligne à la séquence génomique de référence de 6000 pb comprenant le gga-miR-223 (*figure 26.A*).

Les deux premiers transcrits obtenus (version 1 et 2) (*figure 26.B*) sont composés de quatre exons tandis que le troisième isoforme (version 3) (*figure 26B*) est composé de trois exons, ce qui ressemble à l'organisation génique du miR-223 chez l'humain, la souris et le zebrafish.

Après plusieurs essais PCR réalisés sur des cADN de cellules des VS, de cellules CEF et des cellules MSB-1 (*figure 28.A*), aucun amplicon n'a été généré. Une nouvelle stratégie d'assemblage des séquences d'introns de la RNA-seq a été utilisée. Elle consiste à un alignement de toutes ces séquences sur la séquence génomique de référence du poulet (de 6000 pb) afin de former une séquence consensus par le logiciel Geneious (version 8.1.4) (*figure 27.A*). Plusieurs isoformes transcriptionnelles ont été générés (*figure 27.B*). Cette deuxième analyse bio-informatique a été choisie pour le reste des manipulations car elle permet d'avoir une vue globale sur les différentes possibilités d'épissage alternatifs du gga-pri-miR-223.

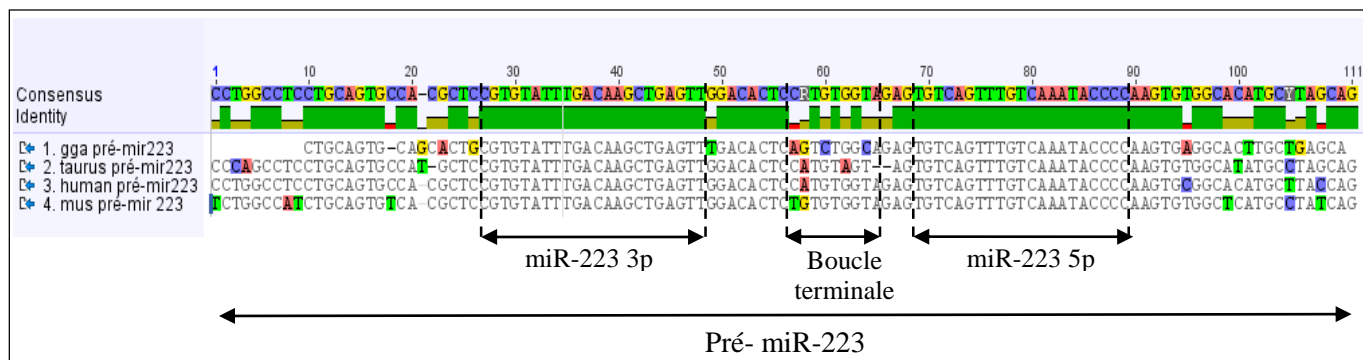


Figure 24: Représentation de l'alignement des séquences du pré-miR-223 par le logiciel Geneious chez quatre espèces de mammifères : 1. Poulet (Gallus Gallus), 2. Taureau (Bos Taurus), 3. Humain (Homo Sapiens), 4. Souris (Mus Musculus). Le brin miR-223 5p est représenté à droite de la boucle du pré-miR-223 et le brin miR-223 3p à gauche de la boucle. Les deux brins ont une taille de 22nt.

Nom de la séquence	Identité entre les espèces
Pré-miR-223	80.2%
miR-223 3p	100 %
miR-223 5p	100 %
Boucle terminale du pré-miR-223	33.3%

Tableau 10: Représentation des pourcentages d'identité en pourcentage des deux brins du duplex du miR-223 mature ainsi que la boucle du pré-miR-223 et la séquence du pré-miR-223 entre les espèces mammifères qui sont : le poulet, l'humain, la souris et le taureau.

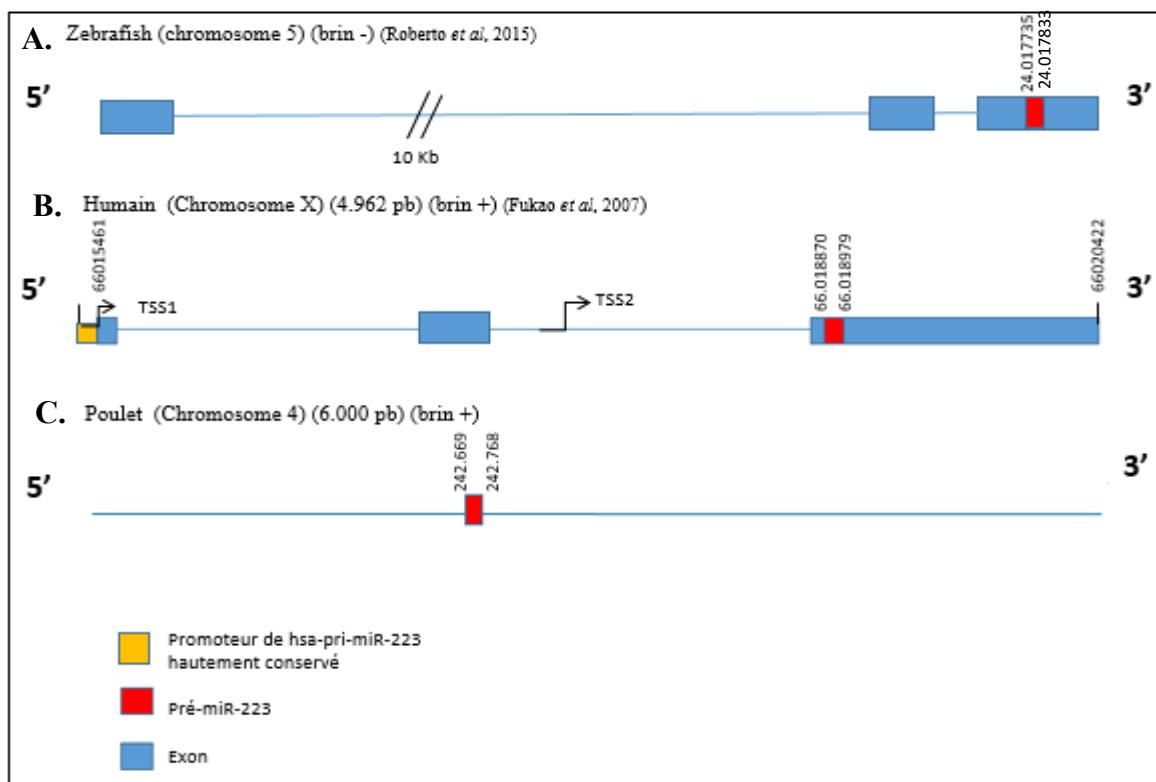


Figure 25: Représentation de l'organisation du gène à miR-223 chez le zebrafish (A), l'humain (B) et le poulet (C) en se basant sur les données du GenBank et la littérature. (A) dre-pré-miR-223 est localisé sur le chromosome 5 (24.017735-24.017833 pb), au niveau du troisième exon de son gène. (B) hsa-pré-miR-223 est localisé sur le chromosome X (66018870-66018979 pb) au niveau du troisième exon de son gène, la boîte jaune représente le promoteur du gène de hsa-miR-223. Les deux flèches noires sur la séquence humaine représentent les deux TSS identifié (TSS1 majeur et TSS2 mineur) (Fukao et al, 2007). (C) gg-pré-miR-223 est localisé sur le chromosome 4 (242669-242768 pb).

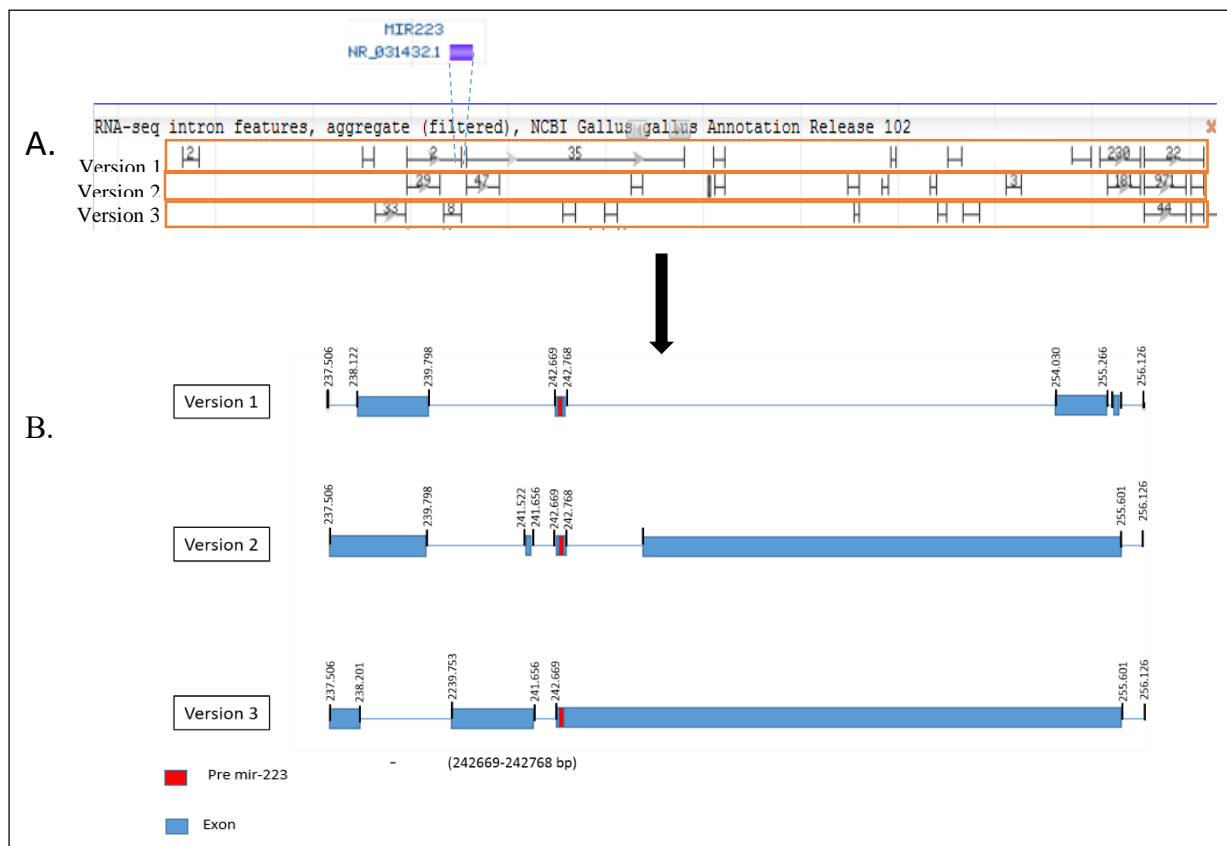


Figure 26: (A) première analyse bio-informatique en utilisant les lectures d'introns de la RNA-seq disponible sur la banque de donnée GenBank, les traits gris représentent les introns et les gaps entre ces traits représentent les exons. (B) Les trois isoformes transcriptionnelles potentiels prédits de gga-pri-miR-223, qui sont nommés : version 1, 2 et 3, les boites bleues représentent les exons et la boites rouge le gg-pré-miR-223.

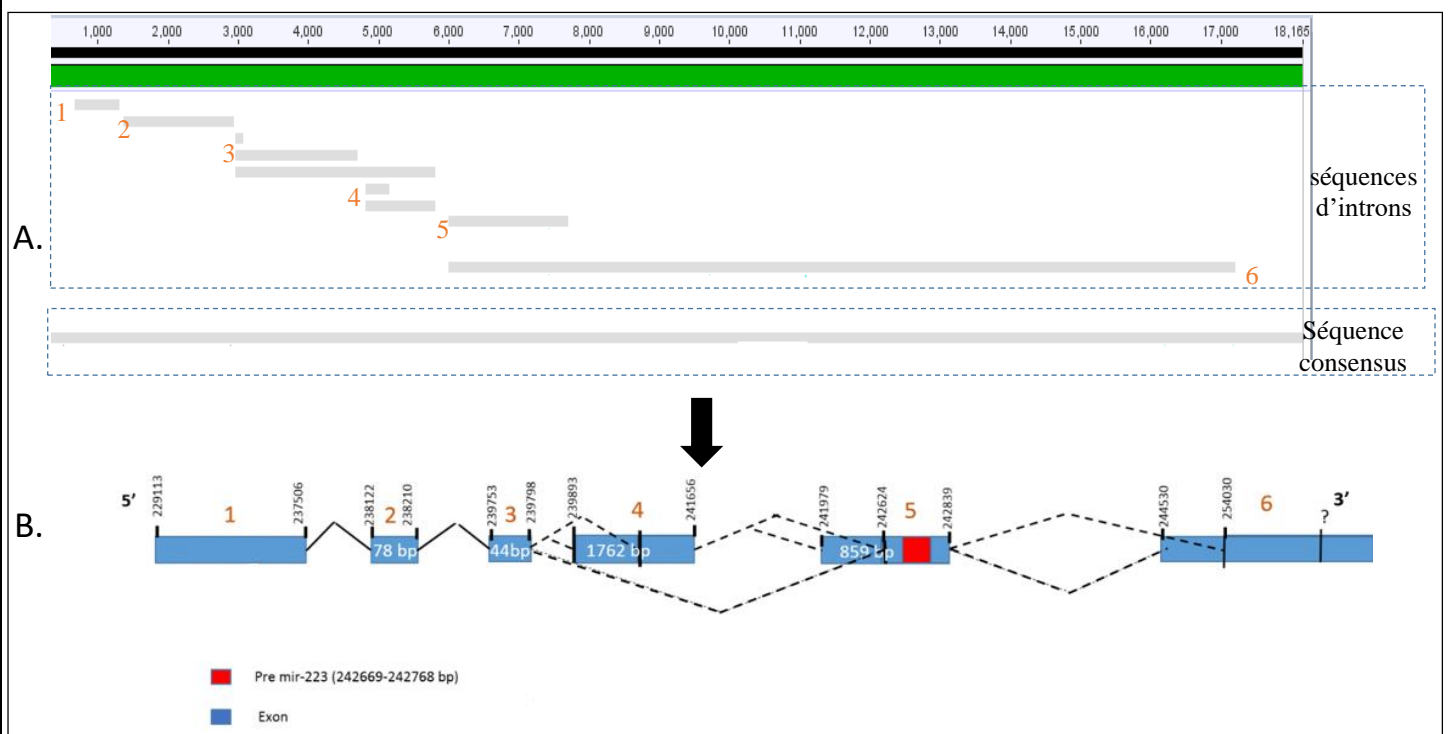


Figure 27: (A) Alignement des fragments d'introns de la RNA-seq (GenBank) en utilisant le logiciel Geneious. Les traits gris représentent les fragments d'introns et les gaps représentent les exons. La dernière ligne représente la séquence consensus. (B) représentation des différents isoformes transcriptionnel générés. Les boites bleues représentent les exons et la boite rouge le gga-pré-miR-223. Les numéros orange au-dessus des exons représentent le numéro de l'exon dans le transcrit et les numéros à l'intérieur des exons représentent la taille de l'exon (pb).

2- Amplification du gga-pri-miR-223 par la PCR nichée :

À partir des différentes prédictions d'isoformes transcriptionnelles du gga-pri-miR-223 obtenus par la deuxième analyse bio-informatique, différents couples d'amorces ont été désignés afin d'amplifier les différents fragments des transcrits potentiels par PCR nichée et ainsi vérifier la prédiction de transcrits associés à l'expression de gga-miR-223.

Différents types cellulaires où l'expression du miR-223 est soit élevée (PBL, CEF, VS à 72h d'incubation) soit réprimée (MSB-1) ont été utilisés. Afin d'obtenir des amplicons de tailles différentes (de 200 à 1000 pb) par PCR nichée, plusieurs paramètres ont été testés. En effet, afin de générer le cADN à partir de l'ARN, la RT non spécifique a été testée en utilisant des hexamères d'amorces aléatoires ainsi que la RT spécifique en utilisant des amorces reverses spécifiques à différents positions des transcrits potentiels (*figure 28*). Ensuite, plusieurs paramètres pour la PCR nichée ont été utilisés: différentes ADN polymérase (Go taq, One taq), plusieurs dilutions des amorces et du cADN et différentes températures d'hybridation (55°C, 58°C, 60°C, 63°C). En testant tous ces paramètres de manière croisée, aucun amplicon n'a été obtenu.

Du à ce résultat, de nouveaux couples d'amorces ont été désignés dans le but d'amplifier par PCR nichée un fragment de petite taille (151 pb) contenant le gga-pré-miR-223 et ses régions flanquantes (*figure 29*) afin de vérifier la présence du gga-pri-miR-223 dans les échantillons. Pour cela, des cellules de VS à 42h, 54h, 66h et 72h d'incubation ont été utilisées. Le cADN a été généré par la RT non spécifique avec 1 µg de matrice ARN. Pour cette expérience, trois CT (contrôles) ont été réalisés, le premier est le CT négatifs obtenu en ajoutant de l'eau à la place du cADN afin de vérifier la présence de contaminants dans le mix. Le deuxième est le CT ADNg (ADN génomique), en ajoutant de l'ARN traité en RT sans la reverse transcriptase. Le but était de vérifier la contamination génomique dans l'échantillon. Enfin, un CT + (positif) a été réalisé en amplifiant le GAPDH qui est un gène exprimé dans tous les types cellulaires. Un amplicon de 151 pb a été généré après la PCR nichée dans tous les échantillons de cADN alors que les contrôles négatifs ne montraient pas cet amplicon (*figure 30*). La taille de cet amplicon correspond à la taille prédite par bio-informatique. Les résultats du séquençage ont confirmé qu'il correspondait à une portion de gga-pri-miR-223 centrée autour des gga-pré-miR-223. Ces résultats sont intéressants car ils nous permettent d'utiliser cet amplicon comme CT de la présence du gga-pri-miR-223 dans les échantillons testés.

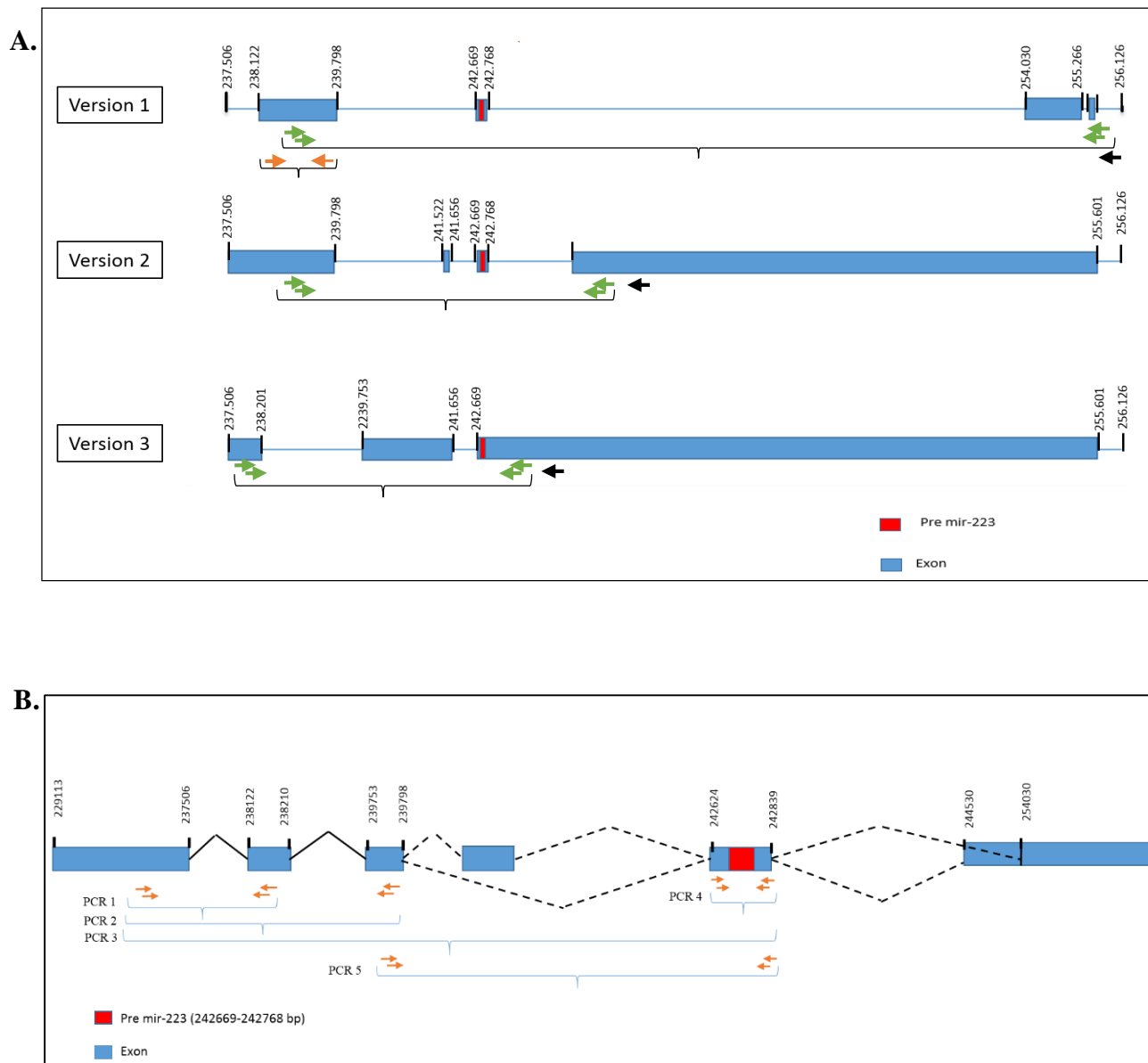


Figure 28: schéma représentant la localisation des amorces forward et reverse désignées pour la PCR et la PCR nichée à partir de la première (A) puis la deuxième (B) analyse bio-informatique. Les boîtes représentent les exons et les flèches représentent les amorces forward et reverse.

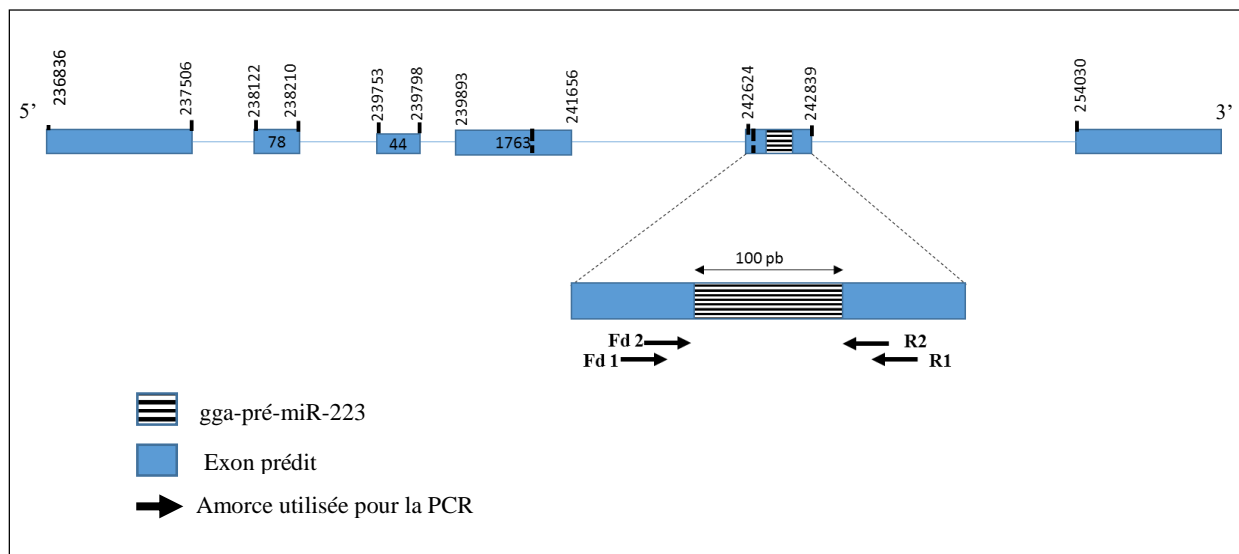


Figure 29: Schéma représentant la localisation des amorces utilisées pour l'amplification en PCR nichée. Les flèches marquées Fd1 (forward) et R1 (reverse 1) représentent les amorces utilisées en PCR. Les flèches marquées FD2 et R2 représentent les amorces utilisées pour la PCR nichée. Les boîtes noires représentent les exons et celle hachurée le gga-pré-miR-223. La taille de l'amplicon attendue après la deuxième PCR (nichée) est de 151 pb (paires de bases).

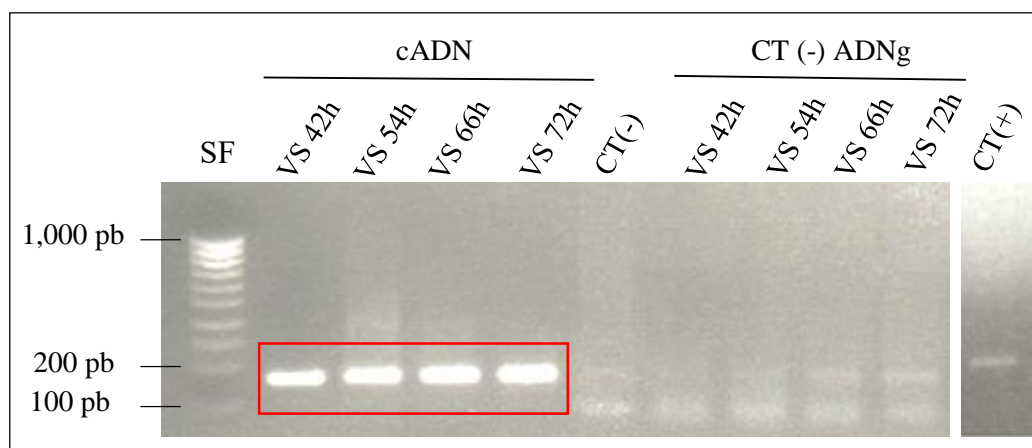


Figure 30: Gel d'électrophorèse représentant les résultats de l'amplification du fragment de 151pb (figure.) par PCR nichée. L'amplification a été réalisée à partir de cADN (ADN complémentaires) des VS de poulet à différents temps d'incubation (42h, 54h, 66h, 72h) et l'amplicon de 151 pb a bien été observé (encadré). Différents CT (contrôles) ont été réalisés : le CT(-) avec l'eau, le CT(-) ADNg (ADN génomique) avec de l'ARN soumis à la RT sans enzyme de la RT pour vérifier la contamination des échantillons avec l'ADN génomique, le CT(+) utilisé est le GAPDH du poulet.

3- Choix d'un système biologique adapté pour l'étude du gga-pri-miR-223 :

Après les différents essais de PCR nichée avec différents paramètres et amorces, un seul fragment de 151 pb du gga-pri-miR-223 a été obtenu. Par conséquent, l'étude s'est orientée vers la recherche d'un système biologique qui permettait la meilleure détection des différents transcrits potentiels du gga-pri-miR-223. Pour ce faire, l'expression du gga-miR-223 a été quantifiée par qRT-PCR dans différents échantillons qui exprime le gga-miR-223: des VS à différents temps d'incubation (42h, 48h, 54h, 60h, 66h, 72h), des cellules de l'aorte de l'embryon de poulet âgée de 3 jours et des cellules de la rate de l'embryon de poulet de 12, 15 et 18 jours. Ces types cellulaires ont été utilisés afin d'établir la cinétique de l'expression du gga-miR-223 et déterminer le moment où le gga-pri-miR-223 est présent en abondance dans la cellule avant d'être clivé par Drosha.

La première étape consiste à déterminer les trois HKG les plus adéquats pour la normalisation des données de quantification du gga-miR-223 dans un type cellulaire donné. Pour cela, une quantification de six HKG candidats a été testée en triplicates techniques par qRT-PCR dans les différents échantillons cités précédemment. Ensuite, le logiciel Genorm a été utilisé afin de classer les HKG selon leurs stabilités dans l'échantillon en calculant la valeur M (*figure 31*). Cette valeur représente la variation moyenne par paires d'un gène de contrôle particulier avec les autres HKG testés. Les HKG avec des valeurs M les plus faibles sont choisis car ils ont une expression plus stable dans l'échantillon (Vandesompele *et al*, 2002). Un seuil de 1 pour la valeur M a été fixé (Hellemans *et al*, 2007). D'après les résultats illustrés dans la *figure 31*, les HKG stables pour les VS sont le GAPDH, la β -actine et le HMBS, pour l'aorte le GAPDH, la β -actine et le SDHA, et enfin pour la rate le SDHA, le HMBS et l'U6.

La deuxième étape est la quantification du gga-miR-223 mature de 22 nt dans les différents échantillons. Pour ce faire, des amorces spécifiques nommées locked nucleic acid (LNA) et primer universel (UP) ont été utilisées (*tableau 8*). Les expériences ont été réalisées en triplicates techniques avec l'utilisation de CT (-) afin de vérifier la présence de contaminants dans le mix. Les résultats de la qRT-PCR sont présentés sous forme de valeurs CT (threshold cycle) qui sont ensuite normalisés par les trois HKG choisis par la méthode Δ CT. Après les analyses statistiques, les résultats ont montré que l'expression du gga-miR-223 ne varie pas en fonction du type cellulaire (VS, aorte ou la rate) ou du temps de développement embryonnaire (*figure 32*). Une autre quantification du gga-miR-223 a été réalisée dans les VS à différents temps d'incubation (42h, 54h, 66h et 78h). Cependant, les résultats sont les mêmes que les précédentes (*figure 33*). A la fin de ces analyses, les VS à 78h ont été choisis comme système biologique pour la suite des analyses pour plusieurs raisons dont la facilité de leur extraction et la capacité d'utiliser plusieurs échantillons. De plus, divers systèmes biologiques ont été testés en amont de ces expériences par le laboratoire d'accueil qui sont les cellules du sang périphérique (PBL), les cellules CEF et les cellules MSB-1, tous ces systèmes montraient une expression significativement inférieure de gga-miR-223 (données de la thèse d'Isabelle Gennart) par rapport aux VS embryonnaires.

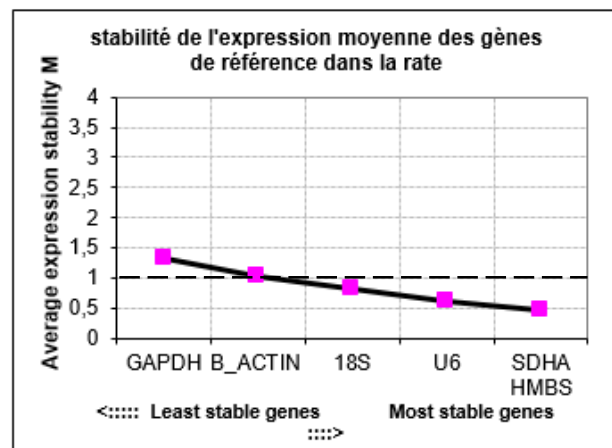
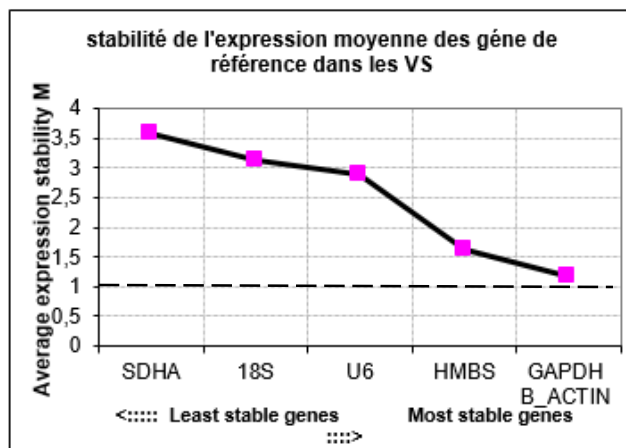


Figure 31: représente des graphiques du classement des gènes de références candidats dans les VS (A), la rate (B) et l'aorte à 72h (C), en fonction de leurs valeurs 'M' calculée par Genorm. Les HKG les plus stables ont une valeur M faible et sont classés sur la partie droite du graphique tandis que les HKG les moins stables sont classés sur la partie gauche du graphique. Les trois gènes de références les plus stables dans chaque échantillon sont choisis pour la normalisation des données de la quantification du gga-miR-223 par Qrt-PCR. La valeur seuil a été fixée à 1.

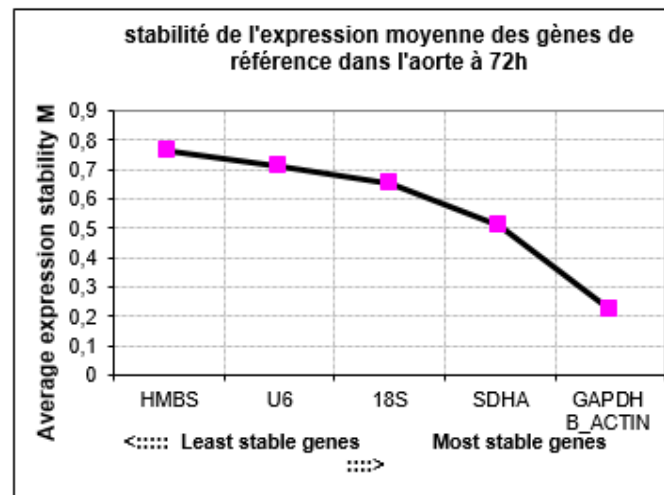


Figure 32: Histogramme représentant l'expression du gga-miR-223 dans différents types cellulaires : les vaisseaux sanguins embryonnaires de poulet, les cellules de l'aorte de l'embryon de 72h, la rate de l'embryon de poulet. La quantification relative est obtenue par la méthode ΔCT et Les barres d'erreurs indiquent les déviations standards (SD) calculées à partir des triplicatas. Les gènes de références utilisés pour la normalisation des résultats de la qRT-PCR sont : (GAPDH, B-Actine et HMBS) pour les VS, (GAPDH, SDHA, B-Actine) pour l'aorte, (SDHA, HMBS, 18S) pour la rate. (NS) : non significatif

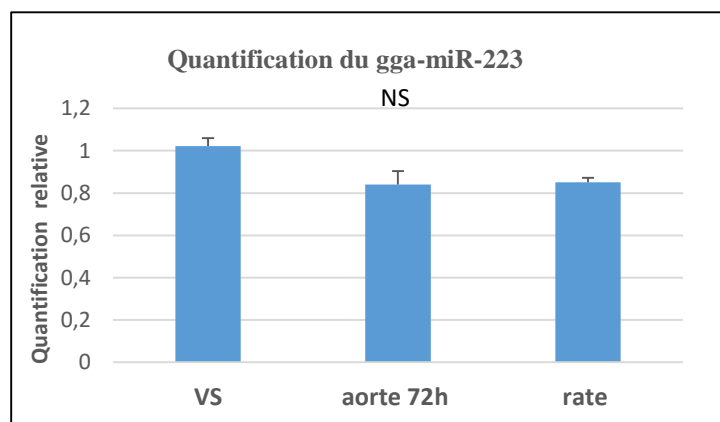
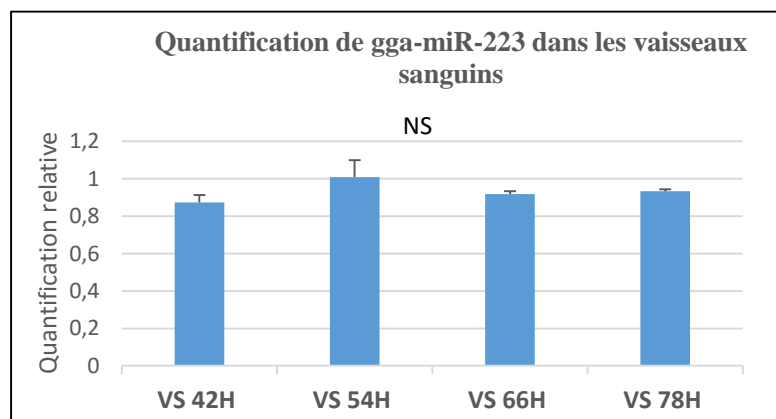


Figure 33: Histogramme représentant l'expression du gga-miR-223 dans les vaisseaux sanguins embryonnaires de poulet à différents temps d'incubation (42h, 54h, 66h, 78h). La quantification relative est obtenue par la méthode ΔCT et Les barres d'erreurs indiquent les déviations standards (SD) calculées à partir des triplicatas de chaque échantillon (n=2). Les gènes de références utilisés pour la normalisation des résultats de la qRT-PCR sont : GAPDH, B-Actine et HMBS. (NS) : non significatif



4- Détection du gga-pri-miR-223 par PCR et qRT-PCR :

Les résultats de la quantification de l'expression du gga-miR-223 par qRT-PCR dans les différents systèmes biologiques testés ont montré que le réseau vasculaire de l'embryon aux temps précoces d'incubation (de 42h à 78h) correspond à un système biologique où l'expression du gga-miR-223 est très élevée. Donc, l'analyse s'est intéressée à la détection du gga-pri-miR-223 par qRT-PCR dans les VS à 78h. Toutefois, ce transcrit primaire est fortement soumis au clivage par Drosha. Il est peu abondant dans les échantillons par rapport aux autres ARNs fortement présents dans le cytoplasme. Afin de pallier à ce problème, une méthode de séparation de l'ARN nucléaire et cytoplasmique a été mise au point dans le but d'enrichir l'échantillon de sa fraction nucléaire et donc en gga-pri-miR-223. La vérification de cet enrichissement a été réalisée par la quantification d'un fragment du gga-pri-miR-223 de 151pb (*figure 29*) ainsi que d'un ARN exclusivement nucléaire (U6) dans la fraction nucléaire et cytoplasmique. Avant de procéder à cette quantification, une étape d'amplification par PCR a été réalisée au préalable en utilisant les couples d'amorces représentés dans la figure 29 (Représentées par fd1 et R1). Cette étape d'amplification semble être primordiale pour la détection de cet amplicon. D'après les résultats de la qRT-PCR, l'enrichissement nucléaire de l'échantillon a fonctionné. En effet, une différence de 8 Ct pour gga-pri-miR-223 et de 6 Ct pour U6 sont observés lorsque l'on compare l'abondance dans le noyau et le cytoplasme.

A partir de cette fraction nucléaire enrichie, des PCR ont été réalisées sur les ADNc générés à partir des ARN nucléaires en utilisant plusieurs amorces localisées dans différentes régions des isoformes transcriptionnelles. Au total, 11 fragments différents ont été testés (*figure 34.A*). A partir du produit PCR, la présence du gga-pri-miR-223 a été détectée par qRT-PCR en amplifiant le fragment de 151 pb (*figure 34.B*). Après analyse, il a été constaté que l'amplification de la plupart des fragments était dû à de la contamination génomique en comparaison avec le CT ADNg sauf deux fragments qui ont été amplifiés par ces deux couples d'amorces : (PCR 3) et Fd6/R1 (*figure 34*).

Les deux produits obtenus lors de la 1^{ère} PCR nommés PCR 3 (Fd3/R1) et PCR 6 (Fd6/R1) ont été utilisés comme matrice pour tester en PCR nichée plusieurs couples d'amorces interne à ces dernières dont celles amplifiant le fragment de 151 pb utilisé comme contrôle (+) (*figure 35.A*). Au total, cinq amplicons différents ont été testés pour chaque produit PCR. Pour cette expérience, d'autres paramètres ont été modifiés notamment le temps d'élongation (4 min) et le nombre de cycle (35 cycles). Après mise sur gel d'électrophorèse des dix produits PCR, des amplicons de tailles différentes ont été obtenus (*figure 35.B*). L'amplicon positif de 151 pb (Fd 12/R2) ainsi que l'amplicon de 169 pb (Fd 13/ R2) ont bien été obtenues après la PCR nichée à partir des deux produits de la 1^{ère} PCR (3 et 6) (*figure 35.B*). Par contre des amplicons de 400 pb et 1200 pb ont été obtenus à partir des mêmes amorces en PCR nichée (Fd 5/ R2) mais avec des produits de 1^{ère} PCR différents (3 et 6 respectivement) (*figure 35.B*). Un amplicon de 600 pb a été obtenue par les amorces Fd6 /R2 en PCR nichée en utilisant le produit PCR (3) (*figure 35.B*). Des amplicons de 600 pb et 1200 pb ont été obtenue en utilisant les amorces (Fd4/ R14) et (Fd 5/ R16) respectivement à partir du produit de la PCR(6) (*figure 35.B*). Les premières observations à partir de ces résultats est que le CT+ a la bonne taille. Ensuite, deux amplicons différents ont été obtenus à partir du même couple d'amorces en PCR nichée (400 pb et 1200 pb), ce qui suppose la présence de deux isoformes transcriptionnelles différents avec des patterns d'épissage différents. Un autre amplicon intéressant est celui de 600 pb obtenue en utilisant les amorces (Fd6/R2) qui sont localisées à une distance de 3000 pb l'un de l'autre sur la séquence génomique du gga-miR-223. L'amplicon obtenue est plus court que la taille génomique. Il ne peut pas résulter d'une amplification génomique.

La dernière étape de cette analyse était d'envoyer ces différents amplicons au séquençage afin de visualiser les séquences et vérifier la spécificité des amorces utilisées. L'analyse des séquences obtenues a été réalisée par alignement de ces dernières à la séquence génomique de référence du gga-miR-223 en utilisant le logiciel Geneious.

L'analyse des amplicons obtenus après le séquençage nous a permis de définir deux types de transcrits primaire du gga-miR-223 dans les cellules des VS à 78h qui sont : la forme épissée et la forme non épissée correspondant à une partie de la séquence génomique étudiée.

Deux variantes d'épissages de 400 pb et 600 pb ont été déterminées (*figure 36*) en utilisant les amorces (Fd6/R2) et (Fd5/R2) (*figure 34.A*) respectivement en PCR nichée à partir du produit de la 1^{ère} PCR générés par l'amorce Fd3 (sur intron 2) et le R1 (sur exon 5) en aval du pré-miR-223. Les deux transcrits obtenus semblent avoir le même pattern d'épissage mais ce ne sont que de premières observations. Il faudrait avoir le pattern d'épissage pour toute la séquence étudiée or nous n'avons séquencé qu'une partie de celle-ci. Afin de vérifier la fiabilité de la prédiction bio-informatique, un alignement de cette dernière avec les deux variants d'épissages obtenus par PCR nichée a été réalisé en utilisant le logiciel Geneious (*figure 37*). Le premier variant (Fd6/R2) est composé de cinq exons et semble être épissé entre le deuxième et le troisième exon. De plus, d'après la prédiction, la taille de l'amplicon est de 2600 pb or la taille obtenue est de 600 pb donc des régions qui était intronique sont prédites comme exonique. Un exon de 159 pb (numéro 4) a été observé dans les deux variantes alors que la prédiction estime un exon de 644 pb donc plus long. Le dernier exon de 156 pb (numéro 5) semble être commun aux deux variantes obtenues.

Comme dit précédemment des isoformes non épissés ont été obtenus avec une taille de 1200 pb (pour les amorces Fd5/R2), 800 pb (pour les amorces Fd4/R14) et 1000 pb (pour les amorces Fd5/R16) par la PCR nichée à partir du produit de la 1^{ère} PCR (PCR 6) généré par l'amorce Fd 6 (exon 3) et le R1 (sur exon 5). Toutefois, il est difficile de discerner le transcrit du gga-pri-miR-223 et la contamination génomique faiblement présente dans l'échantillon (*figure 34.B*)

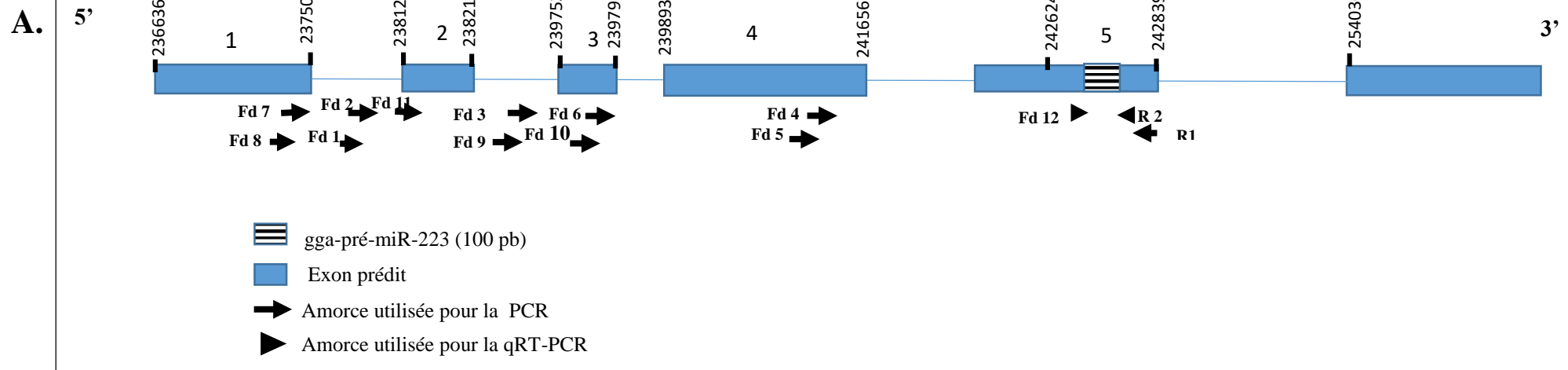
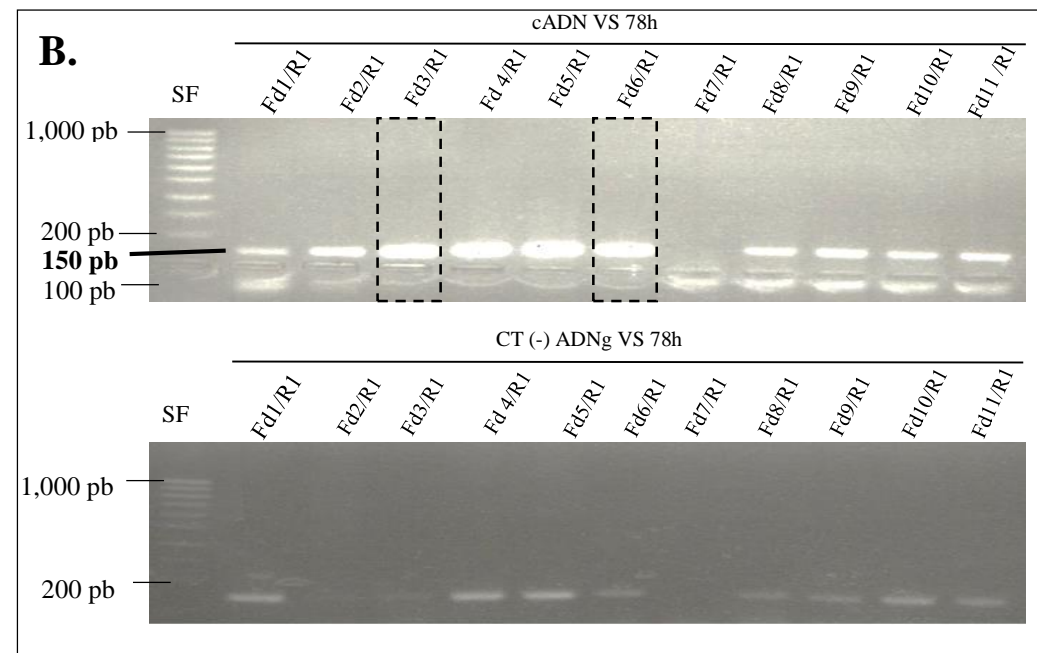


Figure 34: détection d'un amplicon du gga-pri-miR-223 par qRT-PCR dans les VS à 78h.

- (A) Schéma représentant la position des oligonucléotides utilisés pour la PCR (flèches) et qRT-PCR (triangles) sur le gga-pri-miR-223. Les boîtes noires représentent les exons et la boîte hachurée le gga-pri-miR-223. Les amorces Fd sont les forward et les amorces R sont les reverses. La taille de l'amplicon attendue après la qRT-PCR est de 151pb.
- (B) Gel d'électrophorèse représentant les amplicons obtenus par qRT-PCR à partir de différents amplicons obtenus par la PCR. Le SF représente le marqueur de taille moléculaire (100-1.000 pb). la bande du gel supérieur représente les cADN (ADN complémentaire), la bande du gel inférieur représente le CT ADNg (ADN génomique). La taille de 150 pb a été obtenue dans presque tous les puits. Les puits encadrés (3 et 6) correspondent à des amplicons sans contamination génomique vérifié par qRT-PCR.



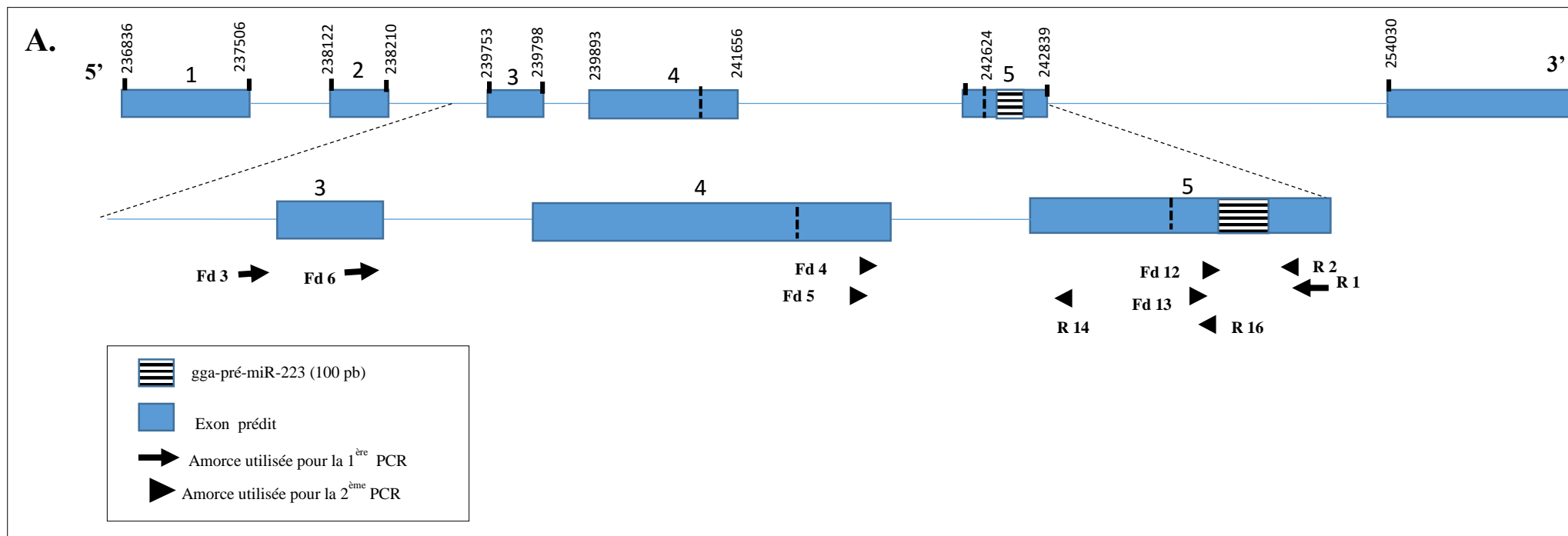
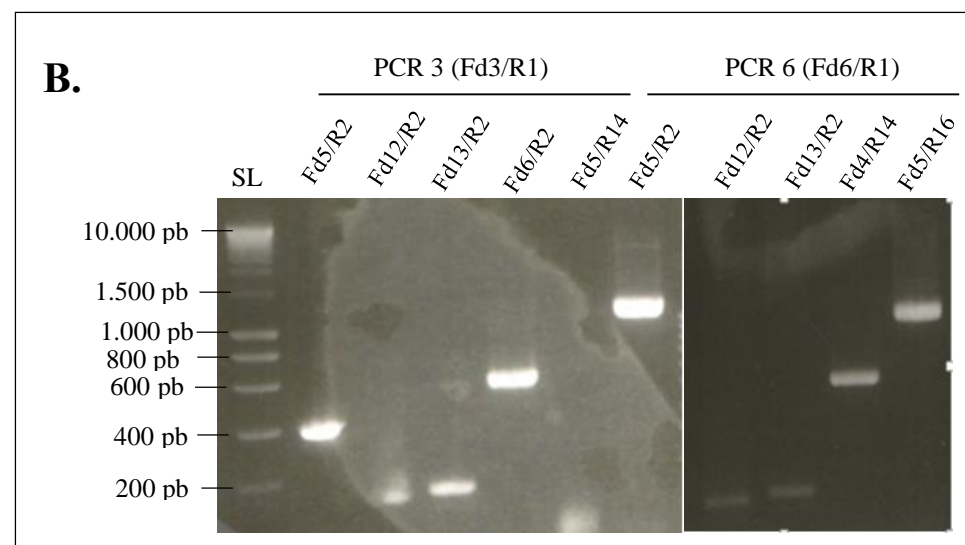


Figure 35: amplification de différents fragments par PCR nichée dans les VS à 78h.

- (A) Schéma représentant la position des oligonucléotides utilisés pour la PCR (flèches) et PCR nichée (triangles) sur le gga-pri-miR-223. Les boîtes noires représentent les exons et la boîte hachurée le gga-pré-miR-223. Les amorces Fd sont les forward et les amorces R sont les reverses. Les amorces Fd3/R1 et Fd6/R1 ont été utilisés pour la PCR. cinq couples d'amorces ont été testés à partir de chaque produit PCR.
- (B) Gel d'électrophorèse représentant les amplicons obtenue par PCR nichée à partir de différents amplicons obtenus par la 1^{ère} PCR. Le SL représente le marqueur de taille moléculaire (200- 10.000 pb). la PCR3 représentent les amplicons obtenues à partir de l'amplicon (Fd3/R1) de la PCR. La PCR6 représentent les amplicons obtenues à partir de l'amplicon (Fd6/R1) de la PCR différents amplicons. L'amplicon (Fd12/R2) de 151 pb correspond à la bonne taille.



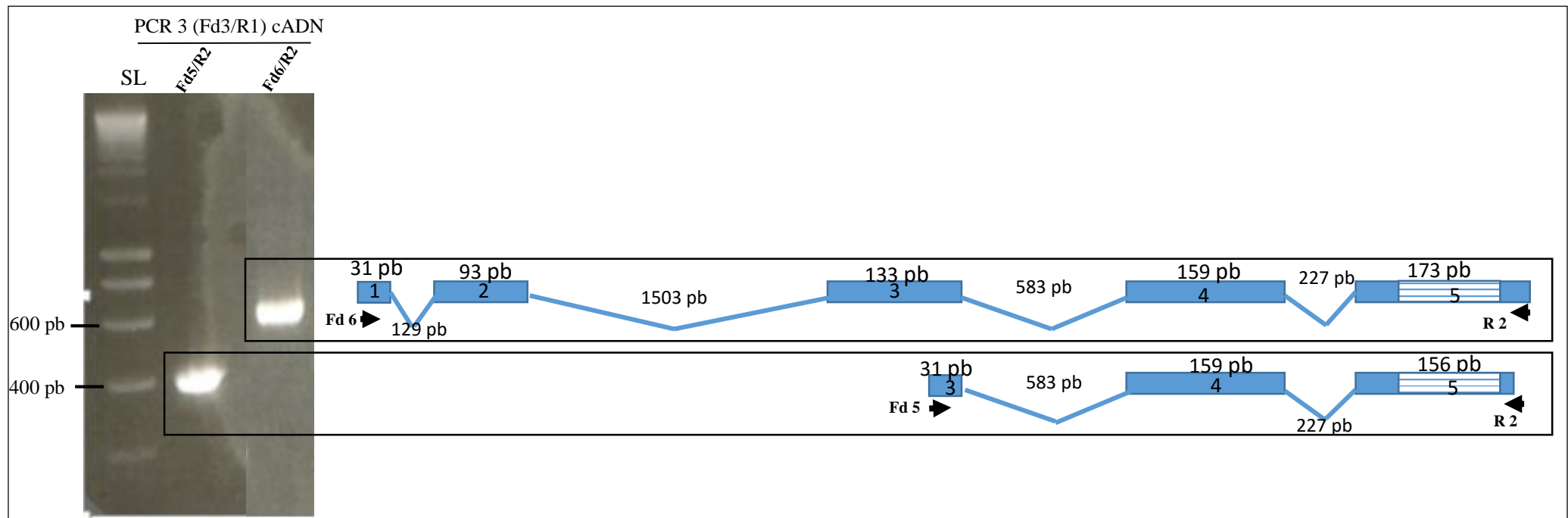


Figure 36: schéma représentant les deux variantes d'épissages du *gga-pri-miR-223* de 400 et 600 pb obtenus par les amorces (Fd5/R2) et (Fd/6/R2) respectivement en PCR nichée. Cette PCR nichée a été réalisé en utilisant le produit de la 1^{ère} PCR avec les amorces (Fd3/R1) (revoir figure 35. A). le SL représente le marqueur de taille moléculaire. Les boîtes représentent les exons. Les triangles représentent les oligonucléotides désignés pour l'amplification par PCR nichée. Un amplicon de 400 pb a été obtenu avec les amorces Fd/R2 et un amplicon de 600 pb a été obtenu avec les amorces Fd5/R2. Les chiffres au-dessus de chaque exon représentent sa taille et ceux entre les exons représentent la taille de l'intron épissé.

Discussion :

GaHV-2 est un *alphaherpesvirus* oncogénique qui induit des lymphomes T chez le poulet. Durant les différentes étapes du cycle viral, GaHV-2 modifie l'expression de plusieurs miRs cellulaires de l'hôte dont le gga-miR-223 qui se retrouve réprimé. Ce miR est exprimé dans les cellules hématopoïétiques et plus précisément dans la lignée myéloïde où il est impliqué dans la différenciation d'une grande variété de cellules immunitaires telles que les granulocytes (Ramkissoo *et al*, 2006). De plus, sa répression est liée à l'apparition de désordres inflammatoires ainsi que de cancers tels que les leucémies chez l'humain (Pulikkan *et al*, 2010). Ces évidences impliquent d'un côté, le rôle de ce miR comme suppresseur de tumeurs et de l'autre, l'implication du GaHV-2 dans la répression de ce miR par des modifications épigénétiques ou une altération de sa transcription. L'étude de ce mécanisme potentiel de répression implique la caractérisation du promoteur du gga-miR-223 pour investiguer par exemple les modifications post-traductionnelles des histones ainsi que le niveau de méthylation de ce dernier après l'infection par ce virus.

Les expériences réalisées dans le cadre de ce mémoire voulaient déterminer les isoformes transcriptionnelles potentielles du gga-pri-miR-223 dans le but d'annoter le gène et ainsi localiser le TSS. Les résultats suivants ont été obtenus:

- La séquence du pré-miR223 est conservée entre le poulet et différents espèces dont l'humain et le zebrafish.
- L'analyse bio-informatique a permis la prédiction de variants d'épissages potentiels du gga-pri-miR-223
- L'utilisation de la PCR nichée a permis d'amplifier dans des VS embryonnaire de poule un court fragment du gga-pri-miR-223 contenant le gga-pré-miR-223.
- Le gga-miR-223 est hautement exprimé dans différents systèmes biologiques (les VS, l'aorte et la rate) n'a pas montré de différences significatives entre les échantillons.
- Une technique a été mise au point avec succès pour la séparation nucléaire et cytoplasmique des VS de 78h dans le but d'enrichir l'échantillon en gga-pri-miR-223 peu abondant dans les cellules.
- Deux isoformes transcriptionnelles du gga-pri-miR-223 dont l'un semble être épissé et le deuxième non épissé ont été obtenus par PCR nichée à partir des échantillons enrichies.

Choix d'un système biologique adéquat pour l'étude transcriptionnelle du gga-pri-miR-223:

Afin d'amplifier les isoformes transcriptionnelles prédits par bio-informatique, plusieurs PCR nichées ont été testé avec différents paramètres et amorces dans les VS à 72h ainsi que dans les MSB-1 et les CEF mais aucun amplicons n'a été obtenus. Ces résultats négatifs peuvent être dus à la faible abondance du gga-pri-miR-223 dans les cellules et la difficulté de détecter le moment de son clivage par Drosha. L'inhibition de Drosha est une possibilité de palier à ce problème. En effet, une étude a été réalisée par la doctorante Perrine Raschaert en France (Tours) où elle à inhiber partiellement Drosha dans des cellules MSB-1 permettant l'analyse de deux miRs transcrits par le GaHV-2 qui sont le mdv1-miR-M8 canonique et le mirtron mdv1-miR-M6. En effet, une lignée inductible de MSB-1-shdrosha a été créé en transfectant un vecteur contenant le gène codant pour l'inhibiteur (Sh-ARN) de l'ARNm de Drosha. L'expression de ce gène cloné dans le vecteur est dépendante de l'ajout de la tétracycline. Les résultats indiquent que l'inhibition de ce dernier est estimée à 51%.

Ne disposant pas de ce système d'inhibition de Drosha, nous avons tenté de déterminer un système biologique adéquat où le gga-pri-miR-223 est plus abondant. Pour ce faire, une cinétique de l'expression du gga-miR-223 a été réalisée par q RT-PCR dans différents types cellulaire exprimant ce miR qui sont: les VS à différent temps d'incubation (42h, 54h, 66h et 78h), l'aorte d'embryon de

poulet de 72h et la rate sur embryon de poulets de 12, 15 et 18 jours. L'aorte à 72h a été choisie car elle est décrite comme étant le site de maturation des cellules hématopoïétiques issues des cellules souches hématopoïétique du sac vitellin. Ces cellules se différencient en granulocytes et monocytes (Cormier & Dieterlen-Lievre, 1988). Différents temps de développement des VS ont été testés afin de voir la variation de l'expression du gga-miR-223 au cours du développement embryonnaire. Enfin, la rate à des temps de développement tardifs, a été choisie (12j, 15j, 18j) car l'expression de miR-223 a été identifiée abondante dans cet organe lymphoïde à ces moment-là (Hicks *et al*, 2009), en réponse aux événements de prolifération et de différenciation ainsi que la migration des cellules immunitaires qui se déroulent à ces stades du développement du poulet. Les résultats de la quantification du gga-miR-223 n'ont pas montré de différence significative entre les différents systèmes biologiques testés. Toutefois, l'expérience n'a été réalisée qu'une seule fois, il faudrait faire des répliques biologiques (N=3) afin de pouvoir en tirer d'avantages de conclusions.

Une autre quantification de gga-miR-223 a été réalisée dans les VS à différents temps d'incubation (42h, 54h, 60h, 66h, 72h). Le choix de ce système biologique est justifié par le fait que l'extraction des VS est plus facile et ne nécessite pas de microchirurgie de l'embryon de 72h pour l'aorte ou de sacrifier d'embryons en stade de développement avancé pour la rate. L'expérience a été réalisée en duplicas biologiques et en triplicatas techniques. Après quantification, aucune différence significative n'est observée dans l'expression de gga-miR-223 lors de la cinétique. Tout comme l'expérience précédente, le nombre de réplique biologique est faible (N=2), il faudrait réaliser plus d'expérimentations. L'autre explication de ces résultats non significatifs est les amorces utilisées. En effet, ces oligonucléotides sont localisés sur la forme mature du gga-miR-223 (22 nt). Cette séquence est commune entre le gga-miR-223, le gga-pré-miR-223 et le gga-pri-miR-223 et par conséquence, les résultats obtenus par q-RT-PCR donnent l'amplification de ces trois « structures ». Il serait intéressant de quantifier le gga-miR-223 mature et le gga-pri-miR-223 en utilisant des amorces spécifiques à ce dernier afin de comparer leur expression et d'identifier le meilleur système biologique.

Tous les résultats de la quantification du gga-miR-223 sont normalisés à l'aide de trois gènes de références sélectionnés à partir de 6 gènes candidats grâce au logiciel Genorm. Ces trois gènes sélectionnés sont les contrôles adéquats pour chaque système biologique testé. Ce paramètre est important pour la précision de la normalisation des données ainsi que pour une appréciation de la variation biologique sans confusion avec des variations techniques. Comme expliqué précédemment, le logiciel Genorm a été utilisé pour classer les gènes de référence selon leurs stabilités en calculant la valeur de la mesure de stabilité M. Les candidats avec une valeur de M en dessous de 1 et la plus faible sont les plus stables. D'après les résultats du programme, La valeur M des gènes de référence choisie pour l'aorte et la rate est en dessous de la valeur seuil de 1 mais la valeur M des gènes des VS est supérieure à cette valeur. Ceci pourrait s'expliquer par l'hétérogénéité de cet échantillon qui contient différents types cellulaires avec différentes fonction tels que des cellules endothéliales, des cellules souches hématopoïétiques et des cellules immunitaires. Il serait intéressant d'investiguer la stabilité avec d'autres gènes de contrôle autre que ceux choisi dans cette étude afin d'identifier les plus adaptés pour ce système biologique.

Détection des isoformes transcriptionnelles de gga-pri-miR-223 par PCR et qRT-PCR:

N'ayant pas obtenu de différence significative de l'expression du gga-miR-223 dans les systèmes biologiques testés. Une autre analyse a été réalisée et qui consistait à la détection du gga-pri-miR-223 dans les VS à 78h par qRT-PCR. Pour ce faire, une séparation nucléaire et cytoplasmique a été réalisée dans le but d'enrichir la fraction nucléaire des VS. Cependant, cette technique de séparation n'est pas adaptée pour ce type d'échantillon car certaines étapes sont difficiles à réaliser dont l'étape de la fragilisation des membranes par gonflement des cellules dû à l'ajout d'un tampon hypotonique. En effet, comme mentionnée précédemment les VS contiennent plusieurs types cellulaires rendant très difficile la visualisation du gonflement des cellules sans les faire éclater. Chaque type cellulaire possède ses propres propriétés et certains peuvent être plus fragiles que d'autres. Il serait intéressant de réaliser l'analyse transcriptionnelle du gga-pri-miR-223 sur des cellules en culture du poulet. D'un côté pour faciliter la séparation nucléaire et cytoplasmique, car il n'y aurait bien qu'un seul type cellulaire identifié, et d'un autre côté contrôler le nombre de cellules. Plusieurs types cellulaires hématopoïétiques du poulet en culture peuvent être utilisés tels que : la lignée mononucléaire du poulet (MQ-NCSU) (Qureshi *et al*, 1990), la lignée de monocyte /macrophage du poulet (HD11) (Beeckman & Vanrompay, 2010) et la lignée monoblastique transformée par le virus de la myéloblastose aviaire (BM2) (Nemajero *et al*, 2003). De plus, un traitement à l'acide rétinoïque pourrait être utilisé dans le but de diriger la différenciation de ces lignées vers la lignée granulocytaire qui semble exprimer un taux élevé de miR-223 chez l'humain et la souris. Cette possibilité se repose sur étude réalisée par Vian et ses collaborateurs qui ont induit la différenciation des lignées de cellules hématopoïétiques progénitrices CD 34+ (HSCs) ainsi que les cellules tumorales promyéloblastique (HL60) en granulocytes par ajout de l'acide rétinoïque (Vian *et al*, 2014).

L'utilisation du petit ARN nucléaire U6 ainsi que le fragment du gga-pri-miR-223 de 151 pb ont confirmé l'enrichissement de la fraction nucléaire en comparaison avec la fraction cytoplasmique en qRT-PCR. Dans cette analyse, un seul CT nucléaire a été utilisé (U6), il serait intéressant d'utiliser un CT cytoplasmique comme RNAt-Lys (Slezak-Prochazka *et al*, 2013). Ceci permettrait de vérifier l'enrichissement cytoplasmique. Cette vérification pourrait aussi se réaliser par western blot en utilisant une protéine cytoplasmique et une protéine nucléaire.

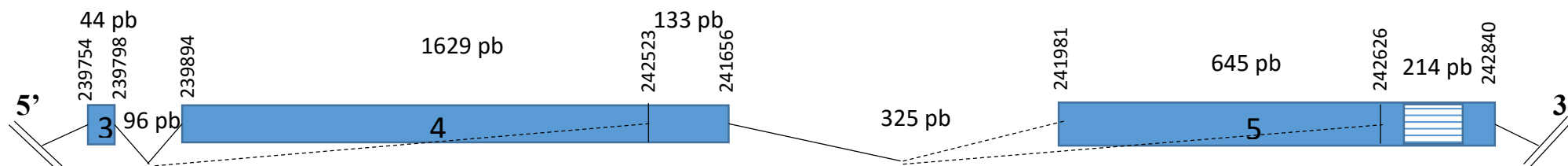
Après une première PCR suivie d'une q-RT-PCR (*figure 34.B*), gga-pri-miR-223 a été amplifié. Après mise sur gel du produit de la qRT-PCR, le gga-pri-miR-223 (151 pb) a été amplifié. Cependant, le cADN utilisé semble être contaminée par de l'ADN génomique et ce même après un traitement préalable à la Dnase I. Pourtant, plusieurs paramètres ont été modifiés pour ce traitement, mais le contaminant est persistant. Ceci peut être expliqué par le fait que le protocole utilisé n'est pas adaptée pour les échantillons enrichis en fraction nucléaire et donc très riche en ADN génomique. Il a été constaté sur gel ainsi que sur les courbes de fusion donnés par qRT-PCR que deux conditions étaient moins sensibles à la contamination génomique (PCR 3 et 6, voir résultats) (*figure 34.B*). Cependant, une légère bande apparaît dans le CT ADNg du produit PCR (6).

Une PCR nichée a été réalisée en utilisant les produits PCR obtenus dans l'expérience précédente (PCR 3 et PCR6) comme matrice pour tester cinq couples d'amorces pour chaque produit PCR (3 et 6). Les résultats de l'amplification ont été visualisés sur gel puis envoyés au séquençage. Il a été retrouvé que les amorces (Fd5/R2) (*figure 35*) ont générées un amplicon de 400 pb qui correspond à un transcrit épissé avec le produit PCR 3 et un amplicon de 1200 pb qui correspond à un transcrit non épissé ciblée avec le produit PCR6. Cependant, la présence d'une légère contamination

génomique dans le produit PCR6 peut être la source de ce transcrit non-épissé mais cela reste à confirmer. L'amplicon de 400 pb et de 600 pb (*figure 36.A*) ne représente que la partie amplifiée par les amorces internes de la PCR nichée. Il faudrait utiliser des amorces en amont de celles déjà utilisées afin d'amplifier le reste du transcrit. L'amplicon de 400 pb possède deux exons en commun avec le transcrit provenant de l'amplicon de 600 bp. L'origine de l'amplicon de 400 pb peut être soit du même isoforme transcriptionnelles d'où est issu l'amplicon de 600 pb soit d'un autre isoforme avec une organisation en aval différente. En effet, il a été montré qu'il peut exister plusieurs TSS et plusieurs queues poly A induisant des isoformes transcriptionnelles différents du miR (Qian *et al*, 2015). A ce stade, aucune conclusion ne peut être faite quant aux types d'isoformes transcriptionnelles épissés du gga-pri-miR-223. La comparaison des variants épissés du gga-pri-miR-223 avec la prédiction, indique quelques différences au niveau de la taille d'exons obtenus (*figure 37*). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la RNA-seq de GenBank se base sur le séquençage de cADN issu de plusieurs types cellulaire qui ont probablement des isoformes transcriptionnelles différents du gga-pri-miR-223 selon le type cellulaire.

Ces résultats indiquent l'existence potentielle d'isoformes transcriptionnelles du gga-pri-miR-223 épissés et d'autres non épissée. La question qui se pose est si ces variants transcriptionnels sont issu d'un seule ou de différents type cellulaire en sachant que les VS de 78h est un tissu hétérogènes en cellules. Une autre question est de savoir si la forme non épissée est due à l'amplification d'un variant du gga-pri-miR-223 ou bien juste de la contamination génomique. Toutefois, il faut noter que des études ont montré la possibilité de la présence de formes épissées et non épissées de certains miRs dans une même cellule comme le cas du miR-155 (Slezak-Prochazka *et al*, 2013) et le miR-181 (Presnell *et al*, 2015) chez l'humain.

A. La séquence du gga-pri-miR-223 prédite par bio-informatique (de l'exon prédit 3 à l'exon prédit 5) :



B. Les amplicons du gga-pri-miR-223 obtenus par PCR nichée :

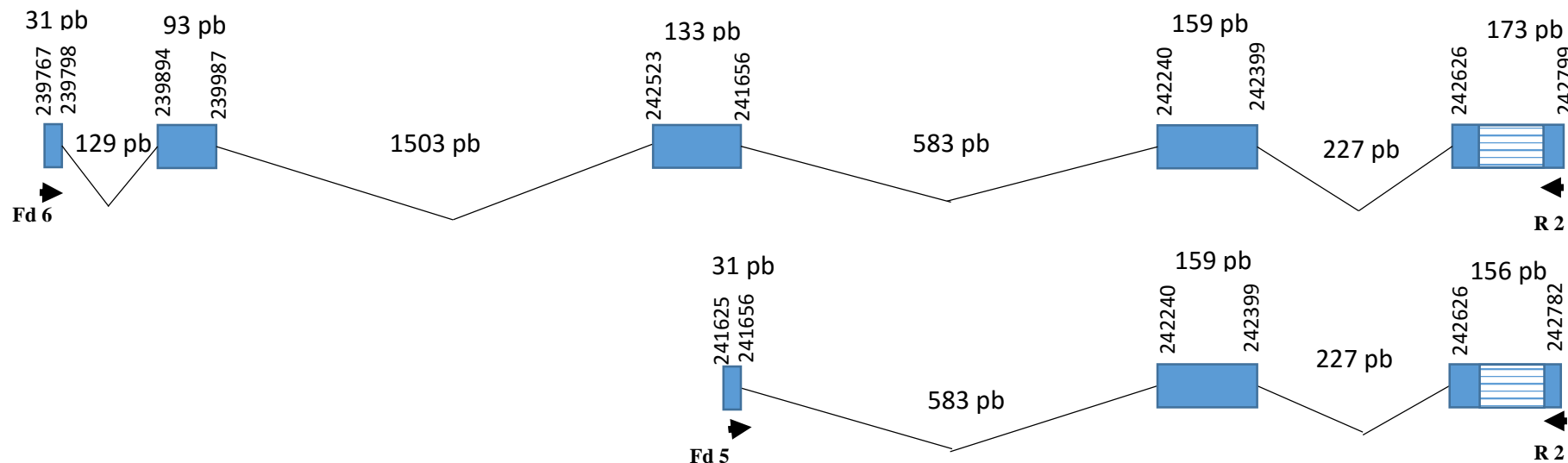


Figure 37 : schéma représentant l'alignement de la séquence prédite du gga-pri-miR-223 par la deuxième analyse bio-informatique (A.) et les amplicons de gga-pri-miR-223 obtenue par PCR nichée (B.). Pour l'alignement, un fragment de la séquence prédite du gga-pri-miR-223 a été représentée (à partir de l'exon 3 jusqu'à l'exon 5). Les boîtes représentent les exons et la boîte hachurée le gga-pré-miR-223 (100 pb). Les flèches noires représentent les amorces forward et reverse utilisées pour l'amplification par PCR nichée à partir de la matrice de la 1^{ère} PCR (Fd3/R1, voir figure). L'amplicon obtenu par les amorces Fd6/R2 a une taille de 600 pb et est composé de cinq exons. L'amplicon obtenu par les amorces Fd5/R2 a une taille de 400 pb et est composé de trois exons.

Conclusion et perspectives :

Pour conclure, cette étude a permis d'établir un protocole de séparation nucléaire et cytoplasmique afin d'enrichir les échantillons en gga-pri-miR-223, faiblement abondants et soumis au clivage par le complexe Drosha. La détection de ce transcrit primaire dans l'échantillon enrichi a été possible en quantifiant un petit fragment contenant le gga-pré-miR-223 par qRT-PCR. Enfin, deux isoformes transcriptionnelles du gga-pri-miR-223 ont été obtenus en amplifiant un fragment de ces derniers par PCR nichée. De plus, des formes épissées et non épissée ont été détectées dans le même échantillon en utilisant les mêmes amorces. Ceci reste à confirmer par d'autres PCR nichée afin de vérifier que l'amplification n'est pas dû à de la contamination génomique. Toutefois, la présence de formes non épissé semble être connue dans les miRs exoniques chez l'humain (par exemple : le gène hsa-miR-181 dans les cellules NK (Presnell *et al*, 2015)). Ces résultats préliminaires sont très encourageants et pourront être approfondie en utilisant d'autres amorces dans d'autre localisation du gène miR-223 afin de vérifier la prédiction dans d'autres régions en amont. De plus, plusieurs types cellulaires de poulet en culture peuvent être utilisés tels que les lignée MQ-NCSU (lignée mononucléaire du poulet), lignée HD11 (lignée monocyte/macrophage du poulet) et la lignée BM2 (monoblastes transformés par virus de la myéloblastose aviaire). Il serait également intéressant d'induire la différenciation de ces lignées en granulocytes par un traitement à l'acide rétinoïque et ainsi augmenter l'expression de gga-miR-223. Une inhibition de Drosha peut aussi être envisageable en ciblant son ARNm par un vecteur inductible contenant le gène Sh-ARN comme l'a réalisé récemment la doctorante Perrine Raschaert avec les cellules MSB-1 du poulet.

En perspective, la détermination des différents isoformes transcriptionnelles du gga-pri-miR-223 dans un échantillon donné permettra de désigner des amorces reverses spécifique pour réaliser la RACE en 5' (5' Rapid Amplification cDNA Ends) dans le but d'identifier le TSS et par la suite décrire le promoteur du gène gga-miR-223. Des analyses pourront se réaliser par la suite pour caractériser le promoteur en déterminant les éléments régulateurs important pour la régulation de l'expression de gga-miR-223 par mesure de l'activité de la luciférase et la mutagenèse dirigée. L'étape suivante serait d'étudier les mécanismes impliquée dans la répression de l'expression du gga-miR-223 dans les cellules infectés par le GaHV-2. Comme cité précédemment, ce virus ainsi que l'EBV et KHSV semblent cibler des promoteurs de gènes cellulaires en induisant des modifications épigénétique. De ce fait, il serait intéressant d'étudier le niveau de méthylation ainsi les modifications post-traductionnelles des histones (HPMTs) du promoteur du gga-miR-223 dans les cellules infectés par GaHV-2 tels que les cellules lymphoblastoïdes MSB-1 où le gga-miR-223 est réprimé. L'étude de la méthylation peut se faire par un traitement bisulfite et l'étude des HPMTs peut se faire avec la méthode de chip (chromatin immunoprécipitation) en ciblant les marqueurs chromatiniens répresseurs.

La bibliographie :

- Allday, M. J. (2013).** EBV finds a polycomb-mediated, epigenetic solution to the problem of oncogenic stress responses triggered by infection. *Frontiers in genetics*, 4: 1- 10
- Allis, C. D., Jenuwein, T., Reinberg, D., Caparros, M.-L. (2006).** Epigenetics. *Cold Spring Harbor: Laboratory Press*
- Ameres, S.L., Zamore, P.D. (2013).**Diversifying microRNA sequence and function, *nature reviews molecular cell biology*, 14: 475- 488
- Baigent, S. & Nair, V. (2004).** In Marek's Disease: An evolving Problem, United Kingdom: Fred, D & Venugopal, N., 208 pages
- Baigent, S. J., Smith, L. P., Nair, V. K., Currie, R. J. W. (2006).** Vaccinal control of Marek's disease: current challenges, and future strategies to maximize protection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 112: 78- 86
- Baigent, S., Nair, V. (2004).** In Marek's Disease: An evolving Problem, United Kingdom: Fred, D & Venugopal, N., 208 pages
- Baigent, S.J., Davison, F. (2004).** Marek's disease virus: biology and life cycle. In Marek's disease: an evolving problem, (ed. F. Davison and V. Nair), 62-77. *Elsevier*
- Barrow, A.D., Burgess, S.C., Baigent, S.J., Howes, K., and Nair, V.K. (2003).** Infection of macrophages by a lymphotropic herpesvirus: a new tropism for Marek's disease virus. *Journal of General Virology*, 84: 2635- 2645.
- Barski A1, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I, Zhao K. (2007).** High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*, 18: 129: 823- 837
- Bartel, D. P. (2009).** MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*, 136: 215 - 233
- Bauernfeind F, Rieger A, Schildberg FA, Knolle PA, Schmid-Burgk JL, Hornung V. (2012).** NLRP3 inflammasome activity is negatively controlled by miR-223. *Journal of Immunology*, 189: 4175 – 4181
- Bentley, D. (2002).** The mRNA assembly line: transcription and processing machines in the same factory. *Current Opinion in Cell Biology*, 14: 336- 342.
- Benton, W.J., Cover, M.S. (1957).** The increased incidence of visceral lymphomatosis in broiler and replacement birds. *Avian Diseases*, Vol 1(No. 3)
- Biggs, P.M. (2004).** In Marek's Disease: An evolving Problem, United Kingdom: Fred, D & Venugopal, N., 208 pages
- Bird, A. (2002).** DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & Development*, 16: 6 - 21
- Blake, M.C., Jambou, R.C., Swick, A.G., Kahn, J.W., and Azizkhan, J.C. (1990).** Transcriptional initiation is controlled by upstream GC-box interactions in a TATAA- less promoter. *Molecular and Cellular Biology*, 10: 6632- 6641

- Breathnach, r., benoit, c., o'hare, k., gannon, f., chambon, p. (1978).** Ovalbumin gene: evidence for a leader sequence in mRNA and DNA sequences at the exon- intron boundaries. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*. 75: 4853- 4857
- Burgess, S.C. (2004).** In Marek's Disease: An evolving Problem, United Kingdom: Fred, D & Venugopal, N., 208 pages
- Burke, T.W., Kadonaga, J.T. (1997).** The downstream core promoter element, DPE, is conserved from Drosophila to humans and is recognized by TAFII60 of Drosophila. *Genes and Development*, 11: 3020- 3031.
- Calnek, B. W. (2001).** Pathogenesis of Marek's disease virus infection. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 255: 25- 55.
- Calnek, B. W., Adldinger, H. K. & Kahn, D. E. (1970).** Feather follicle epithelium: a source of enveloped and infectious cell-free herpesvirus from Marek's disease. *Avian Disease*, 14: 219- 233.
- Cantello, J. L., Anderson, A. S., Morgan, R. W. (1994).** Identification of latency-associated transcripts that map antisense to the ICP4 homolog gene of Marek's disease virus. *Journal of Virology*, 68: 6280- 6290.
- Carninci, P., Sandelin, A., Lenhard, B., Katayama, S., Shimokawa, K., Ponjavic, J., Semple, C.A., Taylor, M.S., Engstrom, P.G., Frith, M.C, et al. (2006).** Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution. *Nature Genetics*, 38: 626- 635.
- Cely, I. (2014).** Rôle des microARNs lors des infections par les virus animaux et humains. Thesis in veterinary medicine, veterinary national school, Toulouse.
- Chang, K.S., Ohashi, K., Lee, S.I., Takagi, M., and Onum, M. (2005).** Detection of the meq gene in the T cell subsets from chickens infected with Marek's disease virus serotype 1. *Japanese Journal of Veterinary Research*, 53: 3- 11
- Chang, T. C., Yu. D., Lee, Y.S., Wentzel, E.A., Arking, D.E., West, K.M., Dang, C.V., Thomas-Tikhonenko,A., Mendell, J.T. (2008).** Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nature Genetics*, 40: 43- 50
- Chen, C.Z., Li, L., Lodish, H.F., Bartel, D.P. (2004).** MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science*, 303: 83- 86
- Chen, H.C., Cheng, S.C. (2012).** Functional roles of protein splicing factors. *Bioscience reports*, 32: 345- 359
- Chen, Q., Wang, H., Liu, Y., et al. (2012).** Inducible microRNA-223 down-regulation promotes TLR-triggered IL-6 and IL-1beta production in macrophages by targeting STAT3. *PLoS ONE*, 7
- Chendrimada, T.P., Finn, K.J., Ji, X., Baillat, D., Gregory, R.I., Liebhaber , S.A., Pasquinelli, A.E., Shiekhattar R. (2007).** MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature*, 14: 823- 828.
- Chendrimada, T.P., Gregory, R.I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., Shiekhattar, R. (2005).** TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*, 7051: 740- 744
- Chuang, J.C., Jones, P.A. (2007).** Epigenetics and MicroRNAs. *Pediatric Research*, 61: 24 - 29.

- Churchill, A. E. & Biggs, P. M. (1967).** Agent of Marek's disease in tissue culture. *Nature*, 215: 528 - 530
- Churchill, A. E., Chubb, R. C. & Baxendale, W. (1969).** The attenuation, with loss of oncogenicity, of the herpes-type virus of Marek's disease (strain HPRS-16) on passage in cell culture. *Journal of General Virology*, 4: 557 - 564
- Conaway, R.C., Conaway, J.W. (1997).** General transcription factors for RNA polymerase II. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 56: 327-346.
- Cormier, F., & Dieterlen-Lièvre, F. (1988).** The wall of the chick embryo aorta harbours M-CFC, G-CFC, GM-CFC and BFU-E. *Development*, 102: 279–285
- Coupeau, D. (2011).** Etude transcriptionnelle et post-transcriptionnelle de la région IRL/TRL du virus de la maladie de Marek. Thèse en virologie, Université de François-Rabelais, Tours
- Cullen, B.R. (2004).** Transcription and processing of human microRNA precursors. *Molecular Cell*, 16: 861-865
- Delecluse, H.J. and Hammerschmidt, W. (1993).** Status of Marek's disease virus in established lymphoma cell lines: herpesvirus integration is common. *Journal of Virology*, 67: 82- 92
- Sotillo, E., Thomas-Tikhonenko, A. (2011).** Shielding the messenger (RNA): microRNA-based anticancer therapies. *Pharmacology & Therapeutics*, 131: 18–32
- Fasseu, M., Treton, X., Guichard, C., Aparicio, T., Daniel, F., Soulé, J.C., Moreau, R., Bouhnik, Y., Laburthe, M., Groyer, A., Ogier-Denis, E. (2010).** Identification of restricted subsets of mature microRNA abnormally expressed in inactive colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *PLoS ONE*, 5
- Fazi, F., Rosa, A., Fatica, A., Gelmetti, V., De Marchis, M.L., Nervi, C., Bozzoni, I. (2005).** A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBP- alpha regulates human granulopoiesis. *Cell*, 123: 819 - 831
- Fehniger, T.A., Wylie, T., Germino, E., et al. (2010).** Next-generation sequencing identifies the natural killer cell microRNA transcriptome. *Genome Research*, 20: 1590- 604
- Felsenfeld, G., Groudine, M. (2003).** Controlling the double helix. *Nature*, 421: 448- 453.
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N., Sonenberg, N. (2008).** Mechanisms of post- transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?. *Nature Reviews Genetics*, 9: 102-114
- Frank, F., Sonenberg, N., Nagar, B. (2010).** Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO-2. *Nature*. 465: 818- 822
- Fukao, T., Fukuda, Y., Kiga, K., Sharif, J., Hino, K., Enomoto, Y., Kawamura, A., Nakamura, K., Takeuchi, T., Tanabe, M. (2007).** An evolutionarily conserved mechanism for microRNA-223 expression revealed by microRNA gene profiling. *Cell*, 129: 617 - 631
- Fukuda, T., Yamagata, K., Fujiyama, S., Matsumoto, T., Koshida, I., Yoshimura, K., Mihara, M., Naitou, M., Endoh, H., Nakamura, T., Akimoto, C., Yamamoto, Y., Katagiri, T., Foulds, C., Takezawa, S., Kitagawa, H., Takeyama, K., O'Malley, B. W., Kato, S. (2007).** DEAD-box RNA helicase subunits of the Drosha complex are required for processing of rRNA and a subset of microRNAs. *Nature Cell Biology*, 9: 604-611.

- Fulci, V., Scappucci, G., Sebastiani, G.D., Giannitti, C., Franceschini, D., Meloni, F., Colombo, T., Citarella, F., Barnaba, V., Minisola, G., Galeazzi, M., Macino, G. (2010).** miR-223 is overexpressed in T-lymphocytes of patients affected by rheumatoid arthritis. *Human Immunology*, 71: 206 - 211
- Gatto, G., Rossi, A., Rossi, D., Kroening, S., Bonatti, S., Mallardo, M. (2008).** Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 transactivates miR-155 transcription through the NF- κ B pathway. *Nucleic Acids Research*, 36: 6608- 6619
- Graveley, B. R. (2001).** Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world. *Trends in Genetics*, 17: 100- 107.
- Green, R.E., Lewis, B.P., Hillman, R.T., Blanchette, M., Lareau, L.F., Garnett, A.T., Rio, D.C., Brenner, S.E. (2003).** Widespread predicted nonsense-mediated mRNA decay of alternatively-spliced transcripts of human normal and disease genes. *Bioinformatics*, 19: 118- 121
- Han J., Pedersen J.S., Kwon C., Belair C.D., Kim Y-K., Yeom K-H., Yang W-Y., Haussier D., Bilelloch R., Kim V.N. (2009).** Posttranscriptional cross regulation between Drosha and DGCR8. *Cell*, 136: 75- 84
- Han, L., Witmer, P. D., Casey, E., Valle, D., Sukumar, S. (2007).** DNA methylation regulates microRNA expression. *Cancer Biology*, 6: 1284- 1288
- Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2011).** Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144: 646- 674
- Haneklaus M, Gerlic M, Kurowska-Stolarska M et al (2012).** Cutting edge: miR-223 and EBV miR-BART15 regulate the NLRP3 inflammasome and IL-1 β production. *Journal of Immunology*, 189: 3795- 3799
- Hariharan, M., Scaria, V., Pillai, B., Brahmachari, S.K. (2005).** Targets for human encoded microRNAs in HIV genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 337: 1214- 1218
- He, L. He.X., Lim, L.P., de Stanchina. E., Xuan, Z., Liang, Y., Xue, W., Zender, L., Magnus, J., Ridzon, D., Jackson, A.L., Linsley. P.S., Chen, C., Lowe, S.W., Michele A. Cleary, M.A., Hannon, G.J. (2007).** A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature*, 447: 1130- 1134
- Hicks, J. a., Tembhurne, P. a., & Liu, H. C. (2009).** Identification of microRNA in the developing chick immune organs. *Immunogenetics*, 61: 231–240
- Huang, J., Wang, F., Argyris, E., Chen, K., Liang, Z., Tian, H., Huang, W., Squires, K., Verlinghieri, G., Zhang, H. (2007).** Cellular microRNAs contribute to HIV-1 latency in resting primary CD4+ T lymphocytes. *Nature Medicine*, 13: 1241 - 1247
- Huang, I., wilkinson, m.f. (2012).** Regulation of nonsense-mediated mRNA decay. *Wiley interdisciplinary reviews RNA*, 3: 807- 828
- Hull, J., Campino, S., Rowlands, K., Chan, M.S., Copley, R.R., Taylor, M.S., Rockett, K., Elvidge, G., Keating, B., Knight, J., Kwiatkowski, D. (2007).** Identification of common genetic variation that modulates alternative splicing. *PLoS Genetics*, 3: e99.

Ismail, N., Ismail, N., Wang, Y., Dakhllallah, D., Moldovan, L., Agarwal, K., Batte, K., Shah, P., Wisler, J., Eubank, T.D., Tridandapani, S., Paulaitis, M.E., Piper, M.G., Marsh, C.B. (2013). Macrophage microvesicles induce macrophage differentiation and miR-223 transfer. *Blood*, 121: 984- 995

Jaenisch, R., and Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics*, 33: 245 – 254

JanHelleman, GeertMortier, Anne De Paepe, F. S. and J. V. (2007). qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology*, 8: R19

Jenuwein, T., Allis, C.D. (2001). Translating the histone code. *Science*, 293: 1074-1080

Jia, C.Y., Li, H.H., Zhu, X.C., et al. (2011). MiR-223 suppresses cell proliferation by targeting IGF-1R. *PLoS ONE*, 6

Jo Vandesompele, Katleen De Preter, Filip Pattyn, Bruce Poppe, Nadine Van Roy, A. D. P. and F. S. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3

Johnnidis, J.B., Harris, M.H., Wheeler, R.T., Stehling-Sun, S., Lam, M.H., Kirak, O., Brummelkamp, T.R., Fleming, M.D., Camargo, F.D. (2008). Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. *Nature*, 451: 1125- 1129.

Jones, PA., Baylin, S.B. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Review Genetics*, 3: 415 - 428

Jopling, C.L., Minkyung, Y., Lancaster, A.M., Lemon, S.M., Sarnow, P. (2005). Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific microRNA. *Science*, 309: 1577-1581

Juven-Gershon, T., Kadonaga, J.T. (2010). Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery. *Developmental Biology*, 339: 225- 229

Kaiser, P., Underwood, G., and Davison, F. (2003). Differential cytokine responses following Marek's disease virus infection of chickens differing in resistance to Marek's disease. *Journal of Virology*, 77: 762-768.

Khochbin, S., Verdel, A., Lemerrier, C., and Seigneurin-Berny, D. (2001). Functional significance of histone deacetylase diversity. *Current Opinion in Genetics and Development*, 11: 162- 166

Khochbin, S., Verdel, A., Lemerrier, C., and Seigneurin-Berny, D. (2001). Functional significance of histone deacetylase diversity. *Current Opinion of Genetic and Development*, 11: 162- 166

Khorasanizadeh, S. (2004). The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell*, 116: 259-272

Kim, V.N. (2005). MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6: 376 - 385

Kim, V.N., Han, J., Siomi, M.C. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Molecular Cell Biology*. 10: 126-139.

Kiriakidou, M., Tan, G.S., Lamprinaki, S., De Planell-Saguer, M., Nelson, P.T., Mourelatos, Z. (2007). An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell*, 129: 1141- 1151

Kouzarides, T. (2002). Histone methylation in transcriptional control. *Current Opinion in Genetics and Development*, 12: 198- 209

Krithivas, A., Fujimuro, M., Weidner, M., Young, D. B., & Hayward, S. D. (2002). Protein Interactions Targeting the Latency-Associated Nuclear Antigen of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus to Cell Chromosomes Protein Interactions Targeting the Latency-Associated Nuclear Antigen of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus to Ce. *Journal of virology*, 76(22), 11596–11604.

Krol, J., Loedige, I., Filipowicz, W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature Reviews Genetics*, 11: 597- 610

Kuo, M.H., vom Baur, E., Struhl, K., and Allis, C.D. (2000). Gcn4 activator targets Gcn5 histone acetyltransferase to specific promoters independently of transcription. *Molecular Cell*, 6: 1309-1320

Lacoste, N., Cote, J. (2003). The epigenetic code of histones. *Medicine Science*, 19: 955- 959.

Laios, A., O'Toole, S., Flavin, R et al. (2008). Potential role of miR-9 and miR-223 in recurrent ovarian cancer. *Molecular Cancer*; 7: 35

Lecellier, C-H., Dunoyer, P., Arar, K., Lehmann-Che, J., Eyquem, S., Himber, C., Saib, A., Voinnet, O. (2005). A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells. *Science*, 308: 557-560

Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S., Kim, V.N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425: 415-419

Levine, A., Durbin, R. (2001). A computational scan for U12-dependent introns in the human genome sequence. *Nucleic Acids Research*, 29: 4006- 4013.

Lewis, B.P., Shih, I.H., Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P., and Burge, C.B. (2003). Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*, 115: 787-798.

Li S, Li Z, Guo F et al. (2011). miR-223 regulates migration and invasion by targeting Artemin in human oesophageal carcinoma. *Journal of Biomedical Science*, 18: 24.

Li, E. (2002). Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nature Reviews Genetics*, 3: 662 - 673

Li, E. (2002). Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nature Reviews Genetics*, 3: 662- 673

Li, G., Cai, M., Fu, D., et al. (2012). Heat shock protein 90B1 plays an oncogenic role and is a target of microRNA-223 in human osteosarcoma. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 30: 1481-1490.

Li, T., Morgan, M.J., Choksi, S., Zhang, Y., Kim, Y.S., Liu, Z.G. (2010). MicroRNAs modulate the noncanonical transcription factor NF-kB pathway by regulating expression of the kinase IKK α during macrophage differentiation. *Nature Immunology*, 11: 799–805

- Li, X., Zhang, Y., Zhang, H., et al. (2011).** miRNA-223 promotes gastric cancer invasion and metastasis by targeting tumor suppressor EPB41L3. *Molecular Cancer Research*, 9: 824- 33
- Li, Y., Chan, E.Y., Li, J., Ni, C., Peng, X., Rosenzweig, E., Tumpey, T.M., Katze, M.G. (2010).** MicroRNA expression and virulence in pandemic influenza virus-infected mice. *Journal of Virology*, 84: 3023 - 3032
- Li, Y.T., Chen, S.Y., Wang, C.R., et al. (2012).** Amelioration of collagen-induced arthritis in mice by lentivirus-mediated silencing of microRNA-223. *Arthritis & Rheumatology*, 10: 3240- 3245.
- Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L., Hannon, G.J. (2004).** Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*. 305: 1437- 1441
- Lu, T.X., Lim, E.J., Besse, J.A., Itskovich, S., Plassard, A.J, Fulkerson, P.C., Aronow, B.J., Rothenberg, M.E. (2013).** MiR-223 deficiency increases eosinophil progenitor proliferation. *Journal of Immunology*, 190: 1576-1582.
- Luo, J., Sun, A.J., Teng, M., Zhou, H., Cui, Z.Z., Qu, L.H., Zhang, G.P. (2011).** Expression profiles of microRNAs encoded by the oncogenic Marek's disease virus reveal two distinct expression patterns in vivo during different phases of disease. *Journal of General Virology*, 92: 608-620
- Magdelaine-beuzelin, C. (2010).** Université François - Rabelais de Tours. *Management*, 476.
- Magdelaine-beuzelin, C. (2010).** Université François - Rabelais de Tours. 476.
- Mahajan, V.S., Drake, A., Chen, J. (2008).** Virus-specific host-miRNAs: antiviral defenses or promoters of persistent infection?. *Trends in Immunology*, 30: 1-7
- Marek, J. (1907).** Multiple Nervenentzündung (Polyneuritis) bei Hühnern. *Dtsch Tierärztl Wochenschr*, 417 - 421.
- Maroney P.A., Yu Y., Fisher J., Nilsen T.W. (2006).** Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. *Nature Structural & Molecular Biology*, 13: 1102-1107
- Mas Monteys A., Spengler R.M., Wan J., Tecedor L., Lennox K.A., Xing Y., Davidson B.L. (2010).** Structure and activity of putative intronic miRNA promoters. *RNA*, 16: 495- 505.
- Masciarelli, S., Fontemaggi, G., Di Agostino, S., et al. (2013).** Gain-of-function mutant p53 downregulates miR-223 contributing to chemoresistance of cultured tumor cells. *Oncogene*, 33: 1601- 1608.
- Mayr, C., Bartel, D.P. (2009).** Widespread shortening of 3'UTRs by alternative cleavage and polyadenylation activates oncogenes in cancer cells. *Cells*, 138: 673- 684
- Meng, Z. X., Wang, G. X., & Lin, J. D. (2012).** A MicroRNA circuitry links macrophage polarization to metabolic homeostasis. *Circulation*, 125 : 2815- 2817
- Mitra, A., Luo, J., He, Y., Gu, Y., Zhang, H., Zhao, K., Song, J. (2015).** Histone modifications induced by MDV infection at early cytolytic and latency phases. *BMC Genomics*, 16: 311.

- Mitra, A., Luo, J., Zhang, H., Cui, K., Zhao, K., Song, J. (2012).** Marek's disease virus infection induces widespread differential chromatin marks in inbred chicken lines. *BMC Genomics*, 13: 557.
- Miyoshi, K., Miyoshi, T., and Siomi, H. (2010).** Many ways to generate microRNA-like small RNAs: non-canonical pathways for microRNA production. *Molecular Genetics and Genomics*, 284: 95-103.
- Moles, R., Bellon, M., Nicot, C. (2015).** STAT1: A Novel Target of miR-150 and miR-223 Is Involved in the Proliferation of HTLV-I-Transformed and ATL Cells. *Neoplasia*, 17: 449- 462
- Morgan, R.W., Xie, Q., Cantello, J.L., Miles, A.M., Bernberg, E.L., Kent, J., and Anderson, A. (2001).** Marek's disease virus latency. *Current Top Microbiology Immunology*, 255: 223-243.
- Nam, C.-H., Rabbitts, T. H. (2006).** The role of LMO2 in development and in T cell leukemia after chromosomal translocation or retroviral insertion. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 13: 15- 25
- Narlikar, G.J., Fan, H.Y., and Kingston, R.E. (2002).** Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell*, 108: 475-487
- O'Donnell, K. A., Wentzel, E. A., Zeller, K. I., Dang, C. V., Mendell, J. T. (2005).** C-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature*, 435: 839- 843
- O'Donnell, R.K., Kupferman, M., Wei, S.J., Singhal, S., Weber, R., O'Malley, B., Cheng, Y., Putt, M., Feldman, M., Ziober, B., Muschel, R.J. (2005).** Gene expression signature predicts lymphatic metastasis in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oncogene*, 24:1244-51
- Okada, C., Yamashita, E., Lee, S.J., Shibata, S., Katahira, J., Nakagawa, A., Yoneda, Y., Tsukihara, T. (2009).** A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery. *Science*, 326: 1275-1279
- Okamura K., Hagen J.W., Duan H., Tyler D.M. And Lai E.C. (2007).** The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in Drosophila. *Cell*, 130: 89-100
- Okuhara, A., Nakasa, T., Shibuya, H., Niimoto, T., Adachi, N., Deie, M., Ochi, M. (2012).** Changes in microRNA expression in peripheral mononuclear cells according to the progression of osteoarthritis. *Modern Rheumatology*, 22: 446- 457
- Padgett, R.A., Grabowski, P.J., Konarska, M.M., Seiler, S., Sharp, P.A. (1986).** Splicing of messenger RNA precursors. *Annual reviews of biochemistry*. 55: 1119- 1150
- Palmer, D.K., O'Day, K., Trong, H.L., Charbonneau, H., and Margolis, R.L. (1991).** Purification of the centromere-specific protein CENP-A and demonstration that it is a distinctive histone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88: 3734 - 3738
- Paschos, K., Allday, M. J. (2010).** Epigenetic reprogramming of host genes in viral and microbial pathogenesis. *Trends in microbiology*, 18: 439- 447
- Payne, L.N. (2004).** Pathological responses to infection. In Marek's Disease: An evolving Problem, 78- 97
- Peters, L., Meister, G. (2007).** Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. *Molecular Cell*. 26: 611- 623

- Petersen C.P., Bordeleau M-E., Pelletier J., Sharp P.A. (2006).** Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Molecular Cell*, 21: 533-542
- Pulikkan, J.A., Dengler, V., Peramangalam, P.S., Peer, Zada A.A, Müller-Tidow, C., Bohlander, S.K., Tenen, D.G., Behre, G. (2010).** Cell-cycle regulator E2F1 and microRNA-223 comprise an auto regulatory negative feedback loop in acute myeloid leukemia. *Blood*, 115: 1768-1778
- Qureshi, Mal., Miller, L, Lillehoj, H.S., Ficken, M.D. (1990).** Establishment and characterization of a chicken mononuclear cell line. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 26:237- 250
- Ramkisson, S.H., Mainwaring, L.A., Ogasawara, Y., Keyvanfar, K., McCoy, J.P Jr., Sloand, E.M., Kajigaya, S., Young, N.S. (2006).** Hematopoietic-specific microRNA expression in human cells. *Leukemia Research*, 30: 643 - 647
- Rispens, B. H., van Vloten, H., Mastenbroek, N., Maas, H. J. & Schat, K. A. (1972).** Control of Marek's disease in the Netherlands. I. Isolation of an avirulent Marek's disease virus (strain CVI 988) and its use in laboratory vaccination trials. *Avian Diseases*, 16: 108-125
- Ro, S., Park, C., Young, D., Sanders, K. M., Yan, W. (2007).** Tissue-dependent paired expression of miRNAs. *Nucleic Acids Research*, 35: 5944 - 5953
- Roberto, V. P., Tiago, D. M., Gautvik, K., & Cancela, M. L. (2015).** Evidence for the conservation of miR-223 in zebrafish (*Danio rerio*): Implications for function. *Gene*
- Rodriguez, A., Griffith-Jones, S., Ashurst, J.L., Bradley, A. (2004).** Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Research*, 14: 1902-1910
- Sakamoto S., Morisawa K., Ota K., Nie J., Taniguchi T. (1999).** A binding protein to the DNase I hypersensitive site II in HLA-DR alpha gene was identified as NF90. *Biochemistry*, 38: 3355 - 3361
- Sakamoto, S., Aoki, K., Higuchi, T., Todaka, H., Morisawa, K., Tamaki, N., Hatano, E., Fukushima, A., Taniguchi, T. & Agata, Y. (2009).** The NF90-NF45 complex functions as a negative regulator in the microRNA processing pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 29: 3754- 3769
- Sandberg, R., Neilson, J.R., Sarma, A., Sharp, P.A., Burge, C.B. (2008).** Profiling cells express mRNAs with shortened 3' untranslated regions and fewer microRNA target sites. *Science*, 320: 1643- 1647
- Sarnow, P., Jopling, C. L., Norman, K. L., Schutz, S., Wehner, K. A. (2006).** MicroRNAs: expression, avoidance and subversion by vertebrate viruses. *Nature Reviews Microbiology*. 4: 651-659
- Schnall-Levin, M., Zhao, Y., Perrimon, N., and Berger, B. (2010).** Conserved microRNA targeting in *Drosophila* is as widespread in coding regions as in 3'UTRs. *Proceeding Natlional Acadedmy Science U S A*, 107: 15751-15756.
- Shek, W.R., Calnek, B.W., Schat, K.A., and Chen, C.H. (1983).** Characterization of Marek's disease virus-infected lymphocytes: discrimination between cytolytically and latently infected cells. *Journal of the National Cancer Institute*, 70: 485 - 491

- Shi, Y. (2012).** Alternative polyadenylation: new insights from global analyses. *RNA*, 18: 2105-2117
- Slezak-Prochazka, I., Kluiver, J., de Jong, D., Kortman, G., Halsema, N., Poppema, S., Kroesen, B.J., van den Berg, A. (2013).** Cellular localization and processing of primary transcripts of exonic microRNAs. *PLoS One*, 8:e76647
- Smale, S.T., Kadonaga, J.T. (2003).** The RNA polymerase II core promoter. *Annual Review of Biochemistry*, 72: 449- 479
- Sotillo, E., Thomas-Tikhonenko, A. (2011).** Shielding the messenger (RNA): microRNA-based anticancer therapies. *Pharmacology & Therapeutics*, 131: 18- 32
- Presnell, S.R., Al-Attar A., Cichocki, Jeffrey S.F., Miller, C. T. L. (2015).** Human Natural Killer Cell microRNA: Differential Expression of MIR181A1B1 and MIR181A2B2 Genes Encoding Identical Mature microRNAs. *Genes and Immunity*, 16, 89- 98
- Stik, G. (2012).** Etude de la régulation transcriptionnelle de microARN viraux et cellulaire lors de l'infection par l'herpesvirus oncogène de la maladie de Marek. Thesis in virology, University of François-Rabelais, Tours
- Sugatani T, Hruska KA. (2009).** Impaired micro-RNA pathways diminish osteoclast differentiation and function. *The Journal of Biological Chemistry*, 284: 4667- 4678.
- Sun, G., Li, H., Rossi, J.J. (2010).** Sequence context outside the target region influences the effectiveness of miR-223 target sites in the RhoB 3'UTR. *Nucleic Acids Research*, 38: 239- 252.
- Sun, W., Shen, W., Yang, S., Hu, F., Li, H., Zhu, T.H. (2010).** miR-223 and miR-142 attenuate hematopoietic cell proliferation, and miR-223 positively regulates miR-142 through LMO2 isoforms and CEBP-beta. *Cell Research*, 20: 1158- 1169
- Thénoz, M. (2014).** Dérégulation de l'épissage alternative lors de l'infection par HLTV-1 : rôle de TAX. Thèse de doctorat, Université de Claude Bernnart, Lyon
- Tian, F., Luo, J., Zhang, H., Chang, S., & Song, J. (2012).** MiRNA expression signatures induced by Marek's disease virus infection in chickens. *Genomics*, 99 : 152- 159
- Trabucchi, M., Briata, P., Garcia-Mayoral, M., Haase, A. D., Filipowicz, W., Ramos, A., Rosenfeld, M. G. (2009).** The RNA-binding protein KSRP promotes the biogenesis of a subset of microRNAs. *Nature*, 459: 1010- 1014
- Trapnell C, Williams BA, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, van Baren MJ, Salzberg SL, Wold BJ, Pachter L. (2010).** Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature Biotechnology*, 28: 511- 515
- V. Narry Kim. (2005).** MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6: 376 - 385
- Vasudevan S., Steitz J. (2007).** AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell*, 128: 1105-1118

Wang, H., Huang, Z.Q., Xia, L., Feng, Q., Erdjument-Bromage, H., Strahl, B.D., Briggs, S.D., Allis, C.D., Wong, J., Tempst, P., and Zhang, Y. (2001). Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor. *Science*, 3: 853- 857

Witter, R. L., Nazerian, K., Purchase, H. G. & Burgoyne, G. H. (1970). Isolation from turkeys of a cell-associated herpesvirus antigenically related to Marek's disease virus. *American Journal Veterinary Research*, 31: 525 - 538

Wong, Q.W., Lung, R.W., Law, P.T., et al. (2008). MicroRNA-223 is commonly repressed in hepatocellular carcinoma and potentiates expression of Stathmin1. *Gastroenterology*, 135: 257- 69.

Wu, L., Li, H., Jia, C.Y., et al. (2012). MicroRNA-223 regulates FOXO1 expression and cell proliferation. *FEBS Letter*, 586:1038- 1043.

Xu, J., Wu, C., Che, X., Wang, L., Yu, D., Zhang, T., Huang, L., Li H., Tan, W., Wang, C., Lin, D. (2011). Circulating microRNAs, miR-21, miR-122, and miR-223, in patients with hepatocellular carcinoma or chronic hepatitis. *Molecular Carcinogenesis*, 50: 136-142

Xu, Y., Sengupta, T., Kukreja, L., Minella, A.C. (2010). MicroRNA-223 regulates cyclin E activity by modulating expression of F-box and WD-40 domain protein 7. *The Journal of Biological Chemistry*, 285: 34439- 2446

Yáñez-Mó, M., Siljander, P.R., Andreu, Z., Zavec, AB., Borràs, F.E., Buzas, E., Buzas, K., Casal, E., Cappello, F and al. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4: 27066.

Yao, Y., Zhao, Y., Smith, L. P., Lawrie, C. H., Saunders, N. J., Watson, M., Nair, V. (2009). Differential expression of microRNAs in Marek's disease virus-transformed T-lymphoma cell lines. *Journal of General Virology*, 90 : 1551–1559

Yeom, K. H., Lee, Y., Han, J., Suh, M. R. & Kim, V. N. (2006). Characterization of DGCR8/Pasha, the essential cofactor for Drosha in primary miRNA processing. *Nucleic Acids Research*, 34: 4622- 4629.

Zardo, G., Ciolfi, A., Vian, L., Starnes, L. M., Billi, M., Racanicchi, Maresca, C., Fazi F, Travaglini, L., Noguera, N., Mancini, M., Nanni, M., Cimino, G., Lo-Coco, F., Grignani F, Nervi C. (2012). Polycombs and microRNA-223 regulate human granulopoiesis by transcriptional control of target gene expression. *Blood*, 119: 4034- 4046

Zeng, Y., Cullen, B.R. (2004). Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin-5. *Nucleic Acids Research*. 32: 4776- 4785

Zhuang, G., Meng, C., Guo, X., Cheruku, P.S., Shi, L., Xu, H., Li, H., Wang, G., Evans, A.R., Safe, S., Wu, C., Zhou B. (2012). A novel regulator of macrophage activation: miR-223 in obesity-associated adipose tissue inflammation. *Circulation*, 125: 2892- 28903